



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

DOCTORADO EN BIOQUÍMICA

TESIS DOCTORAL

Manifestaciones extragástricas de la infección por
Helicobacter pylori. Impacto en el sistema
respiratorio

AUTORA: LIC. ANDREA CELESTE ARISMENDI SOSA

DIRECTORA: DRA. ALBA EDITH VEGA

CO-DIRECTORA: DRA. NIDIA NOEMI GÓMEZ

SAN LUIS – 2019

Publicaciones

- ✓ **Arismendi Sosa AC., Salinas Ibañez AG., Pérez Chaca MV., Penissi AB., Gómez NN., Vega AE.** Study of *Helicobacter pylori* infection on lung using an animal model. Microbial Pathogenesis (2018) 123C pp 410-418. ISSN: 1096-1208. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.07.038.
- ✓ **Garro MF., Salinas Ibañez AG., Vega AE., Arismendi Sosa AC., Pelzer L., Saad JR., María AO.** Gastroprotective affects and antimicrobial activity of *Lithraea molleoides* and metabolites against *Helicobacter pylori*. Journal Of Ethnopharmacology 176 (2015) pp 469-474. ISSN: 0378-8741. DOI: 10.1016/j.jep.2015.11.009.
- ✓ **Salinas Ibañez AG., Arismendi Sosa AC., Ferramola FF., Paredes J., Wendel G., Garro MO., Vega AE.** Inhibition of *Helicobacter pylori* and its assoaciatedd urease by two regional plants of San Luis, Argentina. International Journal of Current Microbiology and Applied Science (2017) Vol.6 (9) pp 2097-2106. ISSN: 2319-7706. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.609.258

*A mi mamá, Martha, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, valores,
motivación, pero más que nada, por su amor incondicional.*

Su ayuda fue fundamental en todo este camino.

Agradecimientos

A Dios y la Virgen, por guiarme en el camino y protegerme.

A la Universidad Nacional de San Luis, por permitir que me siga formando como profesional, tanto a nivel científico como docente.

A la Dra. Alba Vega, por su confianza, supervisión y apoyo. Gracias por estar en todo momento, aún en los momentos difíciles, siempre creyó en mí.

A la Dra. Nidia Gómez, por sus conocimientos, soporte y acompañamiento humano en todo el trayecto de esta tesis.

A las Dras. Verónica Pérez Chaca (Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia – Universidad Nacional de San Luis), Alicia Penissi y Laura Mariani (Instituto de Histología y Embriología – Universidad Nacional de Cuyo), por sus aportes, colaboraciones y ayuda.

A mis compañeros de equipo, Gabriel y Florencia, por compartir días de trabajo.

Al área de Microbiología, por ser mi lugar de trabajo todos los días, la confianza y el compañerismo.

A los técnicos Daniel Molina y Marcelo Villegas, por ayudar siempre.

A mi papá, Carlos, que siempre está conmigo.

A mi abuela Hilda, por brindarme cariño, comprensión, amor y siempre ser un pilar.

A mis tías Hilda y Norma, por su acompañamiento y protección.

A mis primos, Luciano y Daniela por ser mis amigos y por estar incondicionalmente.

A mi sobrino ahijado, León, por brindarme momentos de juego y alegría.

A mis amigos por estar presente en todo momento, acompañarnos en nuestras formaciones profesionales y personales.

Índice

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| <i>Helicobacter pylori</i> | 1 |
| Antecedentes | 1 |
| Bacteriología | 2 |
| Genoma | 4 |
| Epidemiología y vías de transmisión | 6 |
| Factores de virulencia | 10 |
| Infección y patologías gástricas | 13 |
| Respuesta inmunitaria en estómago | 18 |
| <i>H. pylori</i> y macrófagos | 25 |
| Patologías extragástricas | 27 |
| Sistema Respiratorio | 30 |
| Estructura de las vías respiratorias | 30 |
| Pulmón | 31 |
| Población del pulmón | 31 |
| Surfactante pulmonar | 34 |
| Unidad pulmonar terminal (UPT) | 34 |
| Respuesta inflamatoria de estroma pulmonar | 35 |
| <i>H. pylori</i> y pulmón | 37 |

OBJETIVOS

| | |
|-----------------------------------|----|
| Objetivos generales y específicos | 47 |
| Objetivo general | 47 |
| Objetivos específicos | 47 |

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| Materiales y métodos | 49 |
| Animales y protocolo de experimentación | 50 |
| Cepa e infección | 50 |
| Medición del índice de inflamación | 50 |
| Extracción de ARN y determinación de expresión de IL-17, iNOS, TNF- α , IL-10, IL-4, IL-1 β , IL-8, I-CAM1, V-CAM1, CCT y MMP-9 | 50 |
| Determinación de carga bacteriana | 56 |
| Identificación bioquímica y molecular de <i>H. pylori</i> en los homogenatos | 56 |
| Análisis de tejido gástrico | 57 |
| Recolección de lavados broncoalveolares (LBA) | 57 |
| Evaluación de la viabilidad de células del LBA | 58 |
| Tipificación de poblaciones celulares | 58 |
| Determinación de proteínas en pulmón | 58 |
| Determinación de Lactato deshidrogenasa (LDH) | 58 |
| Extracción y cultivo de macrófagos de LBA | 59 |
| Determinación de superóxido por Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltatrazol (MTT) | 59 |
| Análisis histopatológico de pulmón | 59 |
| Tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) | 60 |
| Tinción de Tricromico de Masson | 60 |
| Tinción de Ácido periódico de Schiff (PAS) | 61 |
| Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR's) | 61 |
| Medición de la actividad de catalasa (CAT) | 62 |
| Análisis estadístico | 62 |

RESULTADOS

| | |
|---|----|
| Invasividad de <i>H. pylori</i> en ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), estómago y pulmón de ratones infectados por vía orotraqueal | 64 |
| Evaluación del índice de inflamación o marcador de edema pulmonar | 66 |
| Marcadores de disfunción endotelial | 67 |
| Concentraciones de proteínas en LBA | 68 |
| Niveles de Lactato deshidrogenasa (LDH) en LBA | 69 |
| Variación en la viabilidad de células de LBA | 70 |
| Cuantificación de poblaciones de macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares en LBA | 71 |
| Citotoxicidad | 72 |
| Expresión de TNF- α , IL-10, IL-4, IL-1 β , IL-8 | 73 |
| Determinación de peroxidación lipídica a través de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbiturico (TBAR's) en pulmón | 76 |
| Determinación de Catalasa (CAT) | 78 |
| Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) | 79 |
| Metaloproteasa 9 | 80 |
| Fosfocolina citidiltransferasa (CCT) | 81 |
| Investigación de cambios histopatológicos en pulmón | 82 |
| Identificación de macrófagos por PAS | 91 |
| Presencia de tejido conectivo por coloración de Tricromico de Masson | 92 |

DISCUSIÓN

| | |
|-----------|----|
| Discusión | 95 |
|-----------|----|

CONCLUSIONES

| | |
|--------------|-----|
| Conclusiones | 109 |
|--------------|-----|

DESAFÍOS A FUTURO

| | |
|-------------------|-----|
| Desafíos a futuro | 113 |
|-------------------|-----|

BIBLIOGRAFÍA

| | |
|--------------|-----|
| Bibliografía | 116 |
|--------------|-----|

Abreviaturas

| | |
|--------|---|
| ADNc | ADN copia |
| AECI | Células alveolares I |
| AECII | Células alveolares II |
| ARNr | ARN ribosomal |
| BabA | Adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo |
| CagA | Gen A asociado a citotoxina |
| CAT | Catalasa |
| CCT | Fosfocolina citidiltransferasa |
| COX | Ciclooxigenasa |
| EPOC | Enfermedad pulmonar obstructiva crónica |
| EROs | Especies reactivas de oxígeno |
| GLM | Ganglios linfáticos mesentéricos |
| H&E | Hematoxilina-Eosina |
| I-CAM | Molécula de adhesión endotelial |
| IFN | Interferón |
| IL | Interleuquina |
| iNOS | Óxido nítrico sintetasa inducible |
| CD | Células dendríticas |
| LAMP-1 | Proteína de membrana de endosoma tardío |
| LBA | Lavados broncoalveolares |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| LPS | Lipopolisacarido |
| MA | Macrófagos |
| MALT | Tejido linfoide asociado a mucosas |

| | |
|----------------|---|
| MMP-9 | Metaloproteasa 9 |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| NF- κ B | Factor de transcripción nuclear |
| NK | Natural killers |
| NO | Óxido nítrico |
| PAS | Ácido peryódico de Schiff |
| pb | Pares de base |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PI | Post.infección |
| PMN | Polimorfonucleares |
| SabA | Adhesina de unión al ácido siálico |
| T4SS | Sistema de secreción tipo IV |
| TBAR's | Ácido tiobarbitúrico |
| TGF | Factor de crecimiento transformante |
| Th | T helper |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| UPT | Unidad pulmonar terminal |
| VacA | Citotoxina vacuolizante |
| V-CAM | Molécula de adhesión vascular |
| VNC | Viabiles no cultivables |

Introducción

Helicobacter pylori

ANTECEDENTES

La identificación de *Helicobacter pylori* comienza a fines del siglo XIX y principios del siglo XX, cuando diversos investigadores reportaron la presencia de bacterias con forma espiraladas en el estómago de distintos animales. Posteriormente, en 1875, científicos alemanes describieron bacterias con las mismas características en el epitelio del estómago, en personas que padecían úlcera péptica o cáncer gástrico. Para esa época se consideró una posible relación entre la presencia del microorganismo y dichas patologías, pero luego esta idea decayó, probablemente porque personas asintomáticas también mostraban en el estómago las bacterias espiraladas (Kusters y col., 2006).

En el año 1983, un patólogo australiano llamado Robin Warren, junto a Barry Marshall, después de numerosos fracasos, lograron el aislamiento del microorganismo a partir del cultivo de una biopsia gástrica, comprobando la identificación o reconocimiento morfológico, mediante tinción de plata. Ambos científicos afirmaron que esta bacteria podía colonizar la mucosa gástrica y podría ser la responsable de la aparición de patologías a nivel del estómago como; gastritis, úlceras pépticas, y adenocarcinoma gástrico. Este nuevo concepto que se presentaba en la comunidad científica, no sería incorporado con certeza, ya que se pensaba que era imposible que una bacteria pudiera sobrevivir un periodo de tiempo prolongado en el ambiente ácido del estómago y los cuadros clínicos mencionados se atribuían a factores emocionales como el estrés y la alimentación. Para demostrar la validez de su teoría, en 1985 Marshall decidió llevar a cabo un experimento muy riesgoso, realizándose una endoscopia que mostraba una mucosa gástrica intacta, para luego ingerir una suspensión de la bacteria. A los 7 días de la infección voluntaria, el investigador comenzó a sufrir síntomas como náuseas y vómitos. La segunda endoscopia realizada a los 10 días, mostró en la biopsia signos de gastritis y la presencia de la bacteria, cumpliendo los postulados de Koch y ratificando la hipótesis de que esta bacteria era el agente etiológico de la gastritis (Kusters y col., 2006).

Debido a las semejanzas que poseía con el género *Campylobacter* se la denominó *Campylobacter pyloris* y luego *Campylobacter pylori*. Entre las semejanzas se destaca la forma espiralada, el crecimiento en medio rico en condiciones microaerófilas; su sensibilidad a metronidazol y un 34% de contenido en Guanina + Citosina (G+C). Posteriores estudios mostraron la presencia de flagelos, contenido de ácidos grasos y secuenciación del ARN ribosomal (ARNr) 16S permitieron crear un nuevo género, *Helicobacter*, denominándose a partir de aquí como *Helicobacter pylori* a la especie aislada de biopsias humanas (Cava y Cobas, 2003).

En el año 1994, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara a *H. pylori* como carcinógeno tipo I ya que distintas investigaciones demostraron que la infección por esta bacteria inducía cambios en las células de la mucosa gástrica promoviendo el desarrollo de cáncer gástrico. En el año 2005, la comunidad científica reconoce el aporte realizado por los doctores Robin Warren y Barry Marshall otorgándoles el premio Nobel de Medicina. “El descubrimiento de la bacteria *H. pylori* y su rol en la gastritis y úlcera péptica” constituyó un cambio de paradigma tanto en el campo de la gastroenterología, como en la microbiología. Si bien, en los últimos años la investigación del microorganismo permitió entender gran parte de sus características, aún quedan muchas otras por dilucidar.

BACTERIOLOGÍA

H. pylori es un bacilo curvo, gramnegativo, no formador de esporas y microaerófilo estricto. Posee 2-6 flagelos polares que le dan movilidad. Bioquímicamente se utilizan las pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa positivas para su identificación (Castillo-Rojas y col., 2004; Kusters y col., 2006). Las condiciones de cultivo requieren medios sólidos ricos, tales como: agar Brucella o agar Columbia, suplementado con sangre bovina o equina o productos de la misma (Kusters y col., 2006). Para el aislamiento a partir de muestras humanas se usan medios que contienen una mezcla de antibióticos tales como vancomicina, trimetoprim, anfotericina B y cefsulodin (Oxoid). Las placas se incuban en atmósfera microaerófila (3-7% de O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂) a 37°C, durante un periodo de 3 a 7 días, excepto si se trata de aislamiento primario que se incuba hasta los 14 días, antes de descartar como negativo. Los medios líquidos utilizados comúnmente son caldo Brucella, Mueller-Hinton o infusión cerebro-corazón (ICC) suplementados con suero fetal bovino.

Las colonias que se observan en medios sólidos se caracterizan por ser pequeñas, de aproximadamente 1 mm de diámetro, traslúcidas, como gotas de rocío (Vega y col., 2010).

En medios líquidos, una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, se observa un cambio de la morfología celular bacilar a cocoide, las cuales mantienen la viabilidad, pero no son cultivables (VNC). Estas formas permiten la supervivencia del microorganismo en condiciones adversas del ambiente en el cual se encuentra. En ese sentido, el tratamiento con inhibidores de la bomba de protones, también induce formas cocoides del microorganismo en la superficie de la mucosa gástrica, lo que permite su permanencia en el hospedador aumentando el riesgo de re-infección (Fig. 1) (Magalhães y col.; 2005; Vega y col., 2010).

Helicobacter pylori

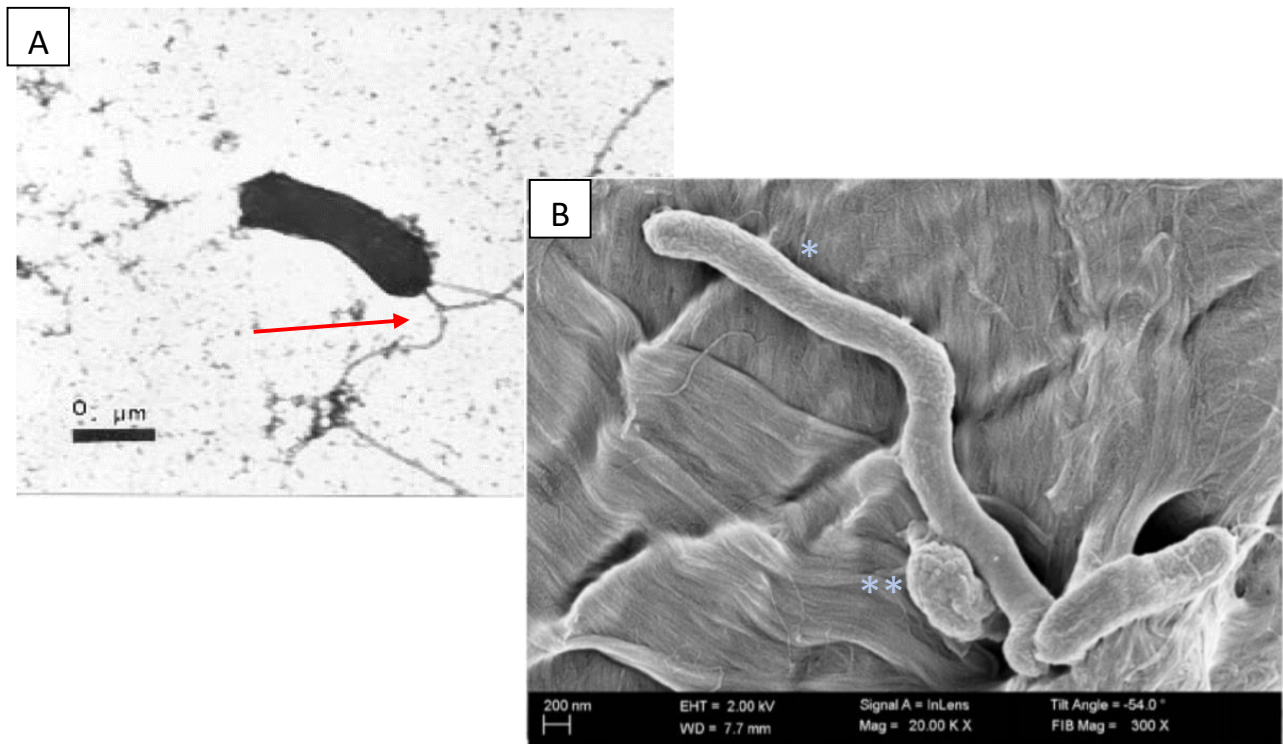


Figura 1: *Helicobacter pylori*. A) Fotografía electrónica de *Helicobacter pylori*. La imagen muestra la morfología característica y la presencia de sus múltiples flagelos señalados con flecha roja (Rivas-Traverso y Hernández, 2000). B) Microscopia de escáner electrónico donde se puede observar la forma filamentosa (*) y cocoide (**) del microorganismo (Krzyżek y col., 2018)

GENOMA

El estudio del genoma del microorganismo se realizó mediante la técnica de random shotgun. Con esta técnica, dos grupos de investigación lograron secuenciar el genoma completo de dos cepas de *H. pylori* (Alm y col., 1999).

En 1997, Tomb y col. disponían de una cepa aislada de un paciente con gastritis en Reino Unido, la cual fue sometida a una serie de cultivos, antes de su secuenciación. Se la denominó 26695 y poseía un cromosoma circular de 1.667.867 pares de base (pb) de longitud, con un contenido de G+C del 39 % y 1590 secuencias codificantes (91% del genoma total). Se encontró la presencia de aminoácidos básicos como arginina y lisina, en una proporción doble a la del genoma de otros procariotas, lo cual podría explicar la adaptación de *H. pylori* al ambiente gástrico (Tomb y col., 1997). Posteriormente, se realizó una re-anotación de los genes, en la cual algunos fueron eliminados como tales, debido a que su tamaño era menor a 150 pb, no estaban bien conservados y poseían codones stop o regiones intergénicas. Por lo tanto, la cepa *H. pylori* 26695 disminuyó el número de regiones codificantes a 1.552.

La segunda cepa se denominó J99, fue aislada de un paciente con úlcera duodenal en Estados Unidos en 1994 y con el mismo se realizaron pocos cultivos, antes de su secuenciación. Posee un cromosoma circular de 1.643.831 pb (24.036 pb menos que la cepa 26695). El contenido de G+C también es de un 39 % y presenta 9 regiones puntuales con un contenido menor. El número de genes encontrados es de 1.495 (90,8 % del genoma), 89 de ellos no están presentes en la cepa 26695, constituyéndose por lo tanto en específicos para la cepa J99 (Alm y col., 1999) (Fig.2).

Genoma de *H. pylori*

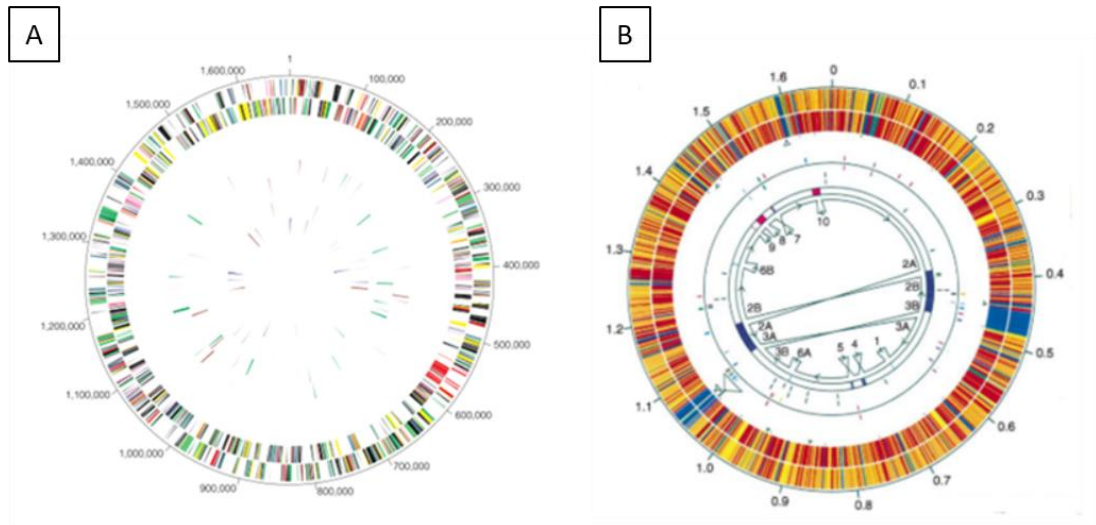


Figura 2: Genoma de cepas de *H. pylori*. A) Cepa 26695 y B) Cepa J99. Genoma completo de ambas cepas secuenciadas a través de técnica de random shot-gun. (Tomb y col, 1997. Alm y col., 1999)

Ambas cepas exhiben 2 copias del ARN ribosomal para la subunidad 16S y 2 copias para la subunidad 23S-5S, en la misma localización del genoma. No obstante, la cepa 26695 presenta una copia adicional de la subunidad 5S huérfana (Alm y col., 1999).

El núcleo del genoma posee 1173 familias de proteínas conservadas y 673 dominios de proteínas conservados en el género *Helicobacter*. Las zonas de plasticidad de *H. pylori* exhiben una gran variabilidad e incluye codificación de sistema de secreción de tipo IV, marcadores de virulencia asociados con cáncer gástrico, linfoma gástrico tipo MALT (linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa) y desarrollo de úlceras, siendo entre ellos el más importante la región *cagA*, que se encuentra presente en el 50-70% de las cepas (Romo Gonzáles y Coria Jiménez, 2010; Torres y Rodríguez, 2008; Thorell y col., 2017). A pesar de la necesidad de que *H. pylori* pueda adaptarse rápidamente a microambientes cambiantes, la expresión de genes está controlada por un repertorio de reguladores transcripcionales escasos y más bien funcionan como redes altamente interconectadas (Thorell y col., 2017).

EPIDEMIOLOGÍA Y VÍAS DE TRANSMISIÓN

La mitad de la población mundial se encuentra infectada con *H. pylori*, presentando menores tasas de infección en países desarrollados (alrededor de 30-40%) comparado con los países en vías de desarrollo, en los que algunos superan el 85% (Zamani y col., 2017). Un estudio realizado a partir de toda la bibliografía disponible respecto a la prevalencia de este microorganismo (a nivel mundial) muestra mayor prevalencia en países de África, Sud América y Oeste asiático, mientras que los países de Oceanía, Oeste de Europa y Estados Unidos muestran menor prevalencia (Fig.3) (Mentis y col., 2015; Hooi y col., 2017).

Prevalencia mundial de *H. pylori*

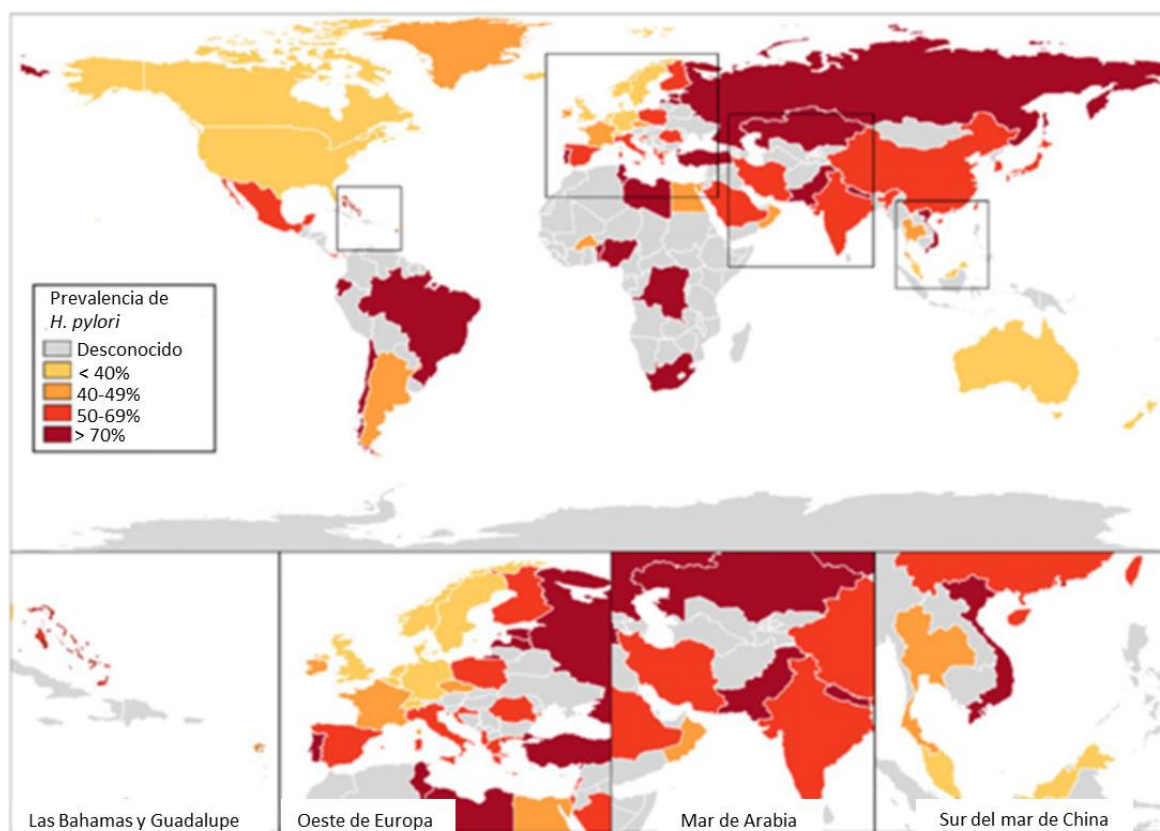


Figura 3: Prevalencia mundial de *H. pylori*. Ciertas regiones se magnifican para mostrar mejor los países más pequeños. Las zonas de mayor prevalencia se destacan con marrón rojizo. La disminución de la intensidad del color, indica disminución de la prevalencia de *H. pylori* (Hooi y col., 2017).

Diversos autores demuestran que la infección por *H. pylori* se adquiere a temprana edad (aproximadamente alrededor de los 10 años), sin embargo, los individuos no presentan síntomas, apareciendo los mismos, mucho tiempo después. Como se muestra en la Figura 4, existen distintos tipos de factores asociados con el riesgo de infección. Los mismos no muestran diferencia cuando se comparan pacientes infectados, de países desarrollados, con aquellos de países en vías de desarrollo (Castillo-Rojas y col., 2004; Kusters y col., 2006; Momtaz y col., 2014; Zamani y col., 2017).

**Factores de riesgo asociados a la posibilidad de contraer infecciones
por *H. pylori***

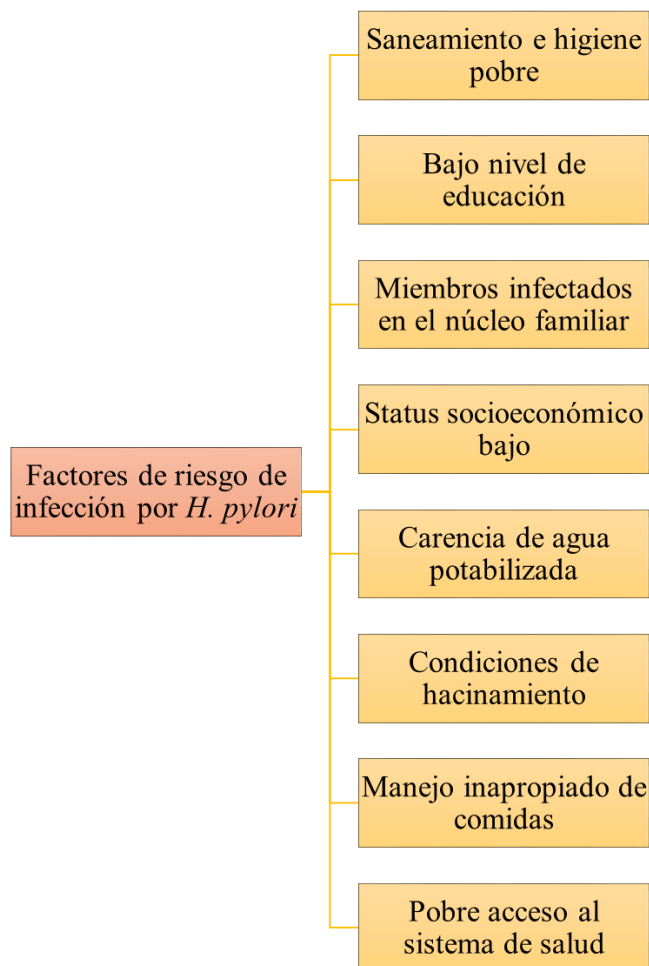


Figura 4: Factores de riesgo asociados a la posibilidad de contraer infecciones por *H. pylori*. Distintos factores de riesgos que han sido asociados con la posibilidad de contraer la infección por parte de *H. pylori* (Zamani y col., 2017).

Las principales rutas por las cuales el microorganismo se transmite entre humanos todavía permanecen sin dilucidar debido a que, hasta el momento, sólo se conoce la permanencia de la bacteria exclusivamente en la mucosa gástrica humana. La mayoría de los investigadores proponen dos formas de transmisión:

- 1) Directa, entre personas.
- 2) Indirecta, de una persona infectada al ambiente, como se muestra en la figura 5 (Montero Campos, 2009; Zamani y col., 2017).

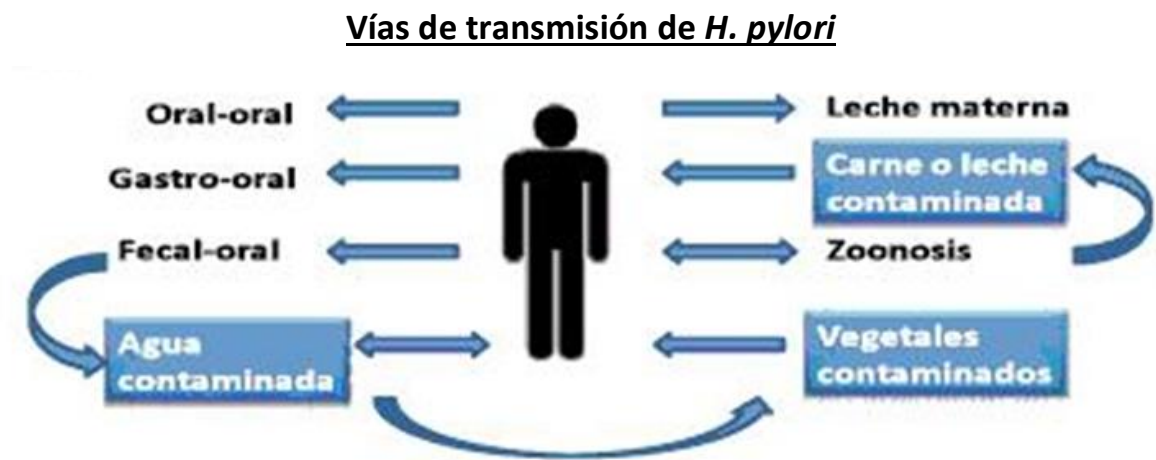


Figura 5: Vías de transmisión de *H. pylori*. Distintas vías de transmisión asociadas con la posibilidad de contraer infección por *H. pylori* (Montero Campos, 2009).

A) De persona a persona:

γ **Gastro-Oral:** Mediante el contacto con el vómito de personas infectadas. Generalmente se asocia con transmisión dentro del mismo núcleo familiar y con el hecho de que la infección ocurre en edades tempranas, ya que los niños tienen mayor facilidad para vomitar y entrar en contacto con estos fluidos (Kuster y col., 2006; Burucoa y Axon, 2017).

γ **Fecal-Oral:** Transmisión del patógeno desde la materia fecal del individuo infectado a la cavidad oral de otra persona sana directamente, o indirectamente por contaminación de: superficies, agua, comida, entre otras (Bui y col., 2016). Si bien, el aislamiento del microorganismo a partir de agua es complicado, se ha documentado el hallazgo de material genético de la bacteria en este medio (Rivas-Traverso y Hernández, 2000). Otra de las teorías

que se postula es la posibilidad de que las moscas puedan actuar como vectores para su diseminación. En ese sentido, Gröbel y col. (1997) demostraron mediante estudios *in vitro* que la mosca se puede infectar a partir de las heces.

γ **Oral-Oral:** se ha sugerido la cavidad oral como reservorio de la bacteria, la cual sería llevada por regurgitación del jugo gástrico, debido a que se la ha podido detectar a partir de saliva y placa dental mediante técnicas moleculares. Además, se ha visto su transmisión en el seno familiar en África, donde las madres pre-mastican el alimento de sus hijos (Stone, 1999; Cava y Cobas, 2003; Montero Campos 2009).

γ **Iatrogénica:** Se ha planteado como una posibilidad excepcional cuando material que ha estado en contacto con la mucosa gástrica de una persona; posteriormente entra en contacto con la mucosa gástrica de una segunda persona, sin una limpieza y esterilización de dicho material, entre un paciente y otro (Cava y Cobas, 2003).

γ **Sexual:** La presencia de forma transitoria o permanente de *H. pylori* en saliva y boca de las personas llevaría a una posible transmisión de una persona infectada a otra que no lo está, mediante sexo oral. De esta forma podría estar asociada a enfermedades urológicas como uretritis, linfoma tipo MALT de la vejiga urinaria, prostatitis crónica y cáncer de próstata. Todavía esta hipótesis sigue en estudio (Dimitriadi, 2014).

B) Ambiental:

γ **Comida:** Estudios epidemiológicos han demostrado una alta prevalencia de *H. pylori* y una más rápida adquisición en zonas con condiciones higiénicas pobres. Se plantea que puede deberse a la ingesta de alimentos comercializados en la calle (Zamani y col., 2017).

γ **Zoonótica:** El aislamiento de *H. pylori* a partir del tejido gástrico de diversos animales, como corderos y vacas, permiten plantear la contaminación de estos productos de origen animal que son de consumo cotidiano. Además, se ha detectado el microorganismo en muestras de leche por nested-PCR (Dore y col., 2001; Momtaz y col., 2014; Osman y col., 2015).

FACTORES DE VIRULENCIA

H. pylori posee distintos factores de virulencia que cumplen un rol específico durante la infección (Fig.6); posibilitan su adhesión, desarrollo y proliferación, en el único nicho ecológico hasta el momento conocido, la mucosa gástrica. La presencia de los mismos en algunas cepas permite caracterizarlas como virulentas frente a las que no los poseen. De diversos factores que se encuentran en estudio, los más relevantes se muestran en la figura 6.

Factores de virulencia de *H. pylori*

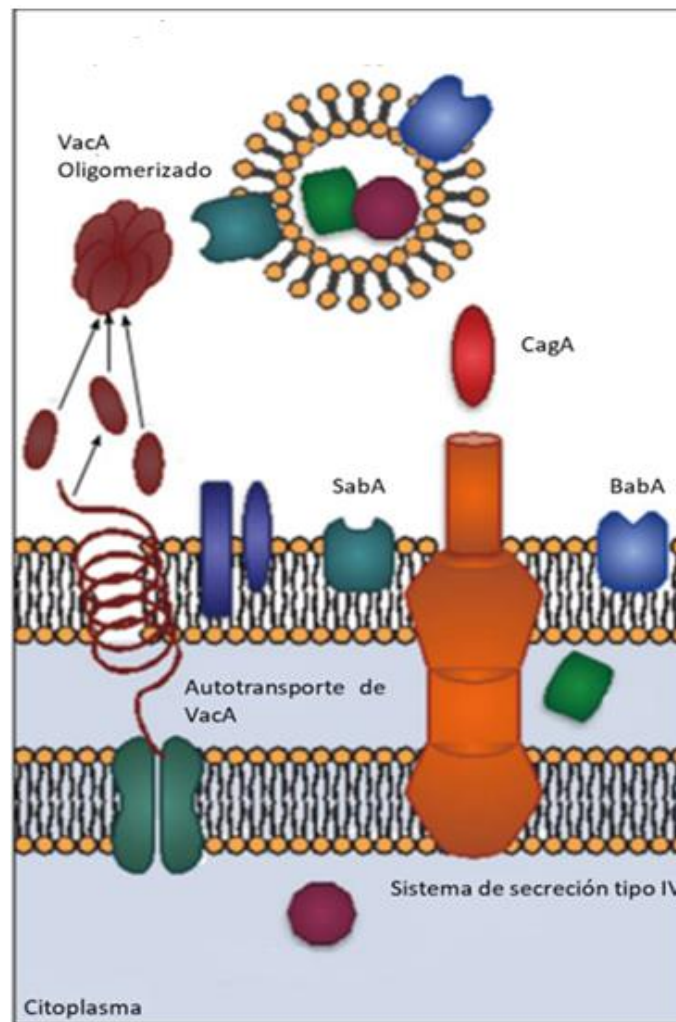


Figura 6: Factores de virulencia de *H. pylori*. Diversos factores de virulencia de *H. pylori* que favorecen la colonización y el mantenimiento en la mucosa gástrica tales como citotoxina vacuolizante (VacA), gen A asociado a citotoxina (CagA), adhesina de unión al ácido siálico (SabA), adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo (BabA), y sistema de secreción tipo IV (Testerman y Morris, 2014).

γ **CagA (Gen A asociado a citotoxina):** es una proteína con una masa molecular de aproximadamente 140 kDa, altamente inmunogénica. Se encuentra codificada por el gen *cagA*, el cual se encuentra presente en un 50-70% de las cepas de *H. pylori*. Se ha visualizado que pacientes infectados con cepas CagA+ tienen una respuesta inflamatoria elevada y mayores riesgos de desarrollar úlceras, gastritis atrófica, y cáncer gástrico. El gen se caracteriza por la presencia de islotes de aproximadamente 40 kb denominados PAI, que codifican entre 27 a 31 proteínas. Ocho de las mismas sirven para la formación de un sistema de secreción tipo IV (T4SS), el cual penetra las células epiteliales gástricas, facilitando la translocación de CagA, peptidoglicano y otros factores bacterianos dentro de las células del hospedador. Afecta la respuesta inmune, ya que induce la apoptosis de células T y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en células epiteliales (Kuster y col., 2006).

γ **VacA (Citotoxina vacuolizante):** Aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori* secretan VacA, una proteína altamente inmunogénica de 95 kDa que induce la vacuolización masiva en células epiteliales *in vitro* y cumple un rol importante en la patogénesis de la úlcera péptica como del cáncer gástrico. Todas las cepas poseen el gen *vacA* funcional, pero existe una variación en las actividades de la toxina entre cepas, debido a la heterogeneidad del gen. VacA contribuye de forma significativa a la colonización gástrica del microorganismo, la cual se realiza mediante la formación de un canal en la membrana, disrupción de la actividad lisosómica y endosómica y efectos en la señalización celular inducida por un receptor de integrina. Además, interfiere con las funciones celulares dependientes del citoesqueleto, induce apoptosis y modula la respuesta inmunitaria (Marchetti y col., 1995; Fahimi y col., 2017). Además, VacA puede interactuar con otros tipos celulares como granulocitos, monocitos, células B y T; esta interacción con las células inmunitarias inhibe la proliferación de las células T inducidas, pero no generan apoptosis (Backert y col., 2016) (Fig.7).

Rol de VacA

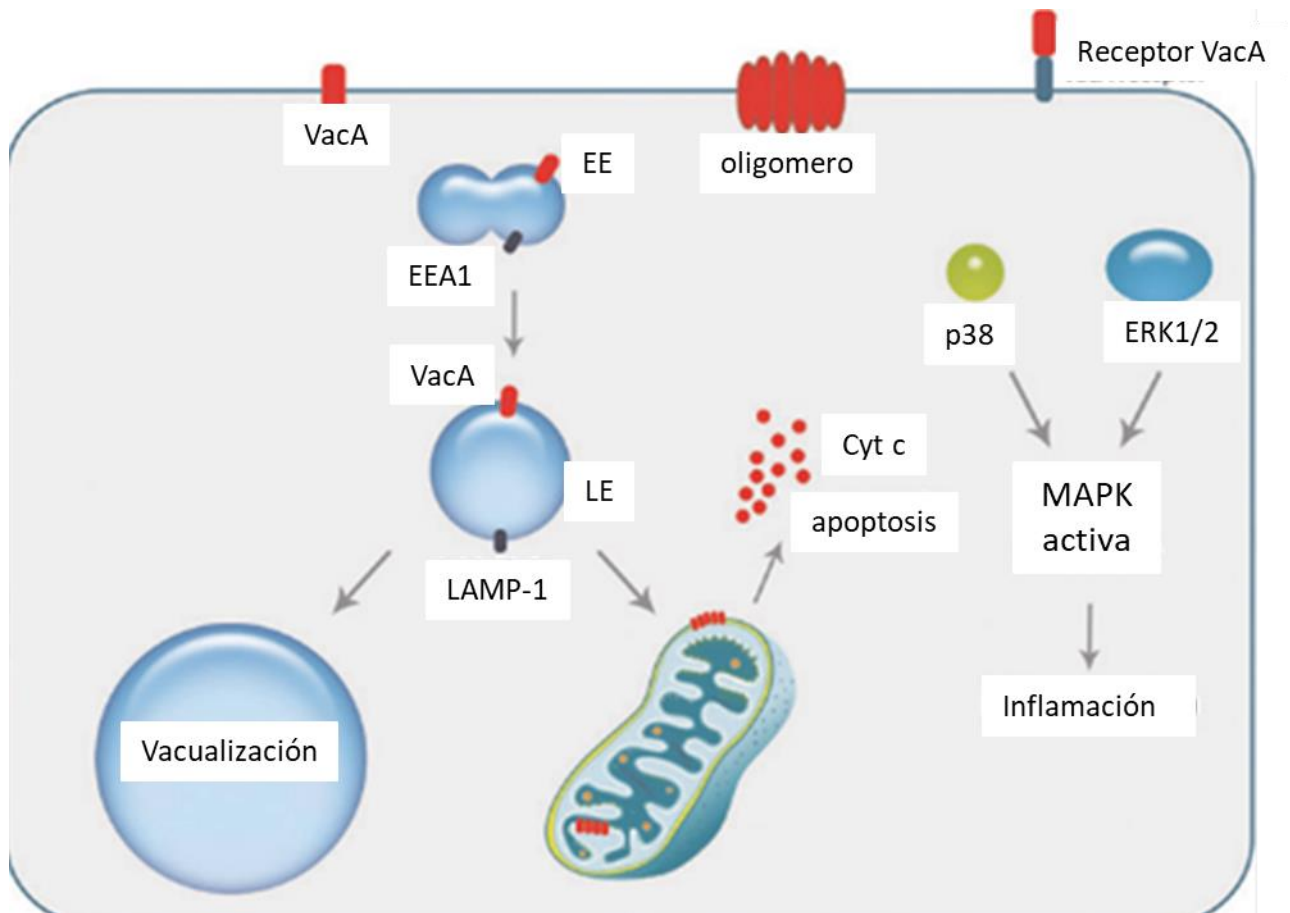


Figura 7: Rol de la citotoxina vacuolizante (VacA). VacA es pinocitado al ambiente intracelular y es dirigido hacia el compartimento endosomal temprano (EE) y luego el compartimento endosomal tardío (LE) que tienen el marcador proteína de membrana 1 se asocia a lisosoma (LAMP-1). A continuación, VacA se oligomeriza en la membrana LE, y se dirige hacia la membrana mitocondrial y mediante una secuencia de señal N-terminal de la toxina puede comenzar la muerte celular programada (apoptosis). Esto se debe a la alteración del potencial de membrana de las mitocondrias, que reclutan los complejos pro-apoptóticos que conducen indirectamente a la liberación del citocromo c (Cyt c). VacA también puede unirse a un receptor de la superficie celular, activando las cascadas de señalización de las map quinasas (MAPK) de forma independiente o en cooperación con CagA. La activación de la ruta MAPK / p38 induce la estimulación de un factor de transcripción que aumenta la expresión de un factor angiogénico y la señal mitótica. Además, VacA fosforila las quinasas ERK1/2, activando la transcripción de varias citoquinas como la IL-1, IL-6 y TNF α que conducen a la inflamación de la mucosa gástrica. VacA oligomerizada actúa como un canal selectivo de iones alterando la concentración de iones cloruros, lo que conduce a un aumento de la actividad de la bomba de protones resultando en un agrandamiento o hinchazón de LE con la consecuente formación de vacuolas (vacuolización) (Fahimi y col., 2017).

γ **Adhesinas y proteínas de membrana externa:** existen diversas moléculas que median la unión de *H. pylori* al epitelio gástrico. Se han identificado 32 genes que codifican para proteínas de membrana externa denominadas OMP (Voss y col., 2014).

γ **Lipopolisacárido (LPS):** El LPS de *H. pylori* sigue la misma estructura que el de todas las bacterias Gram-negativas, con tres dominios: un dominio hidrofóbico de lípido A (endotoxina), un núcleo de oligosacáridos bien conservado y una región variable de polisacáridos denominado antígeno-O. El LPS estimula la producción de Interleuquina (IL)-8 y NF-κB en células inmunitarias y epiteliales de forma dependiente de CagA. Además, podría estar involucrado en una mimetización con los antígenos sanguíneos humanos, promoviendo la evasión a la respuesta inmune y la formación de autoanticuerpos (Li y col. 2016; Kuster y col., 2006).

INFECCIÓN Y PATOLOGÍAS GÁSTRICAS

H. pylori posee diversos factores de virulencia que le posibilitan la entrada en la mucosa gástrica, su movilización parcial o total dentro del mucus protector, penetración entre las células epiteliales e infección crónica y posterior transmisión (Suerbaum y Michetti, 2002). La colonización de la mucosa gástrica *con H. pylori* no constituye una enfermedad, pero si una condición para el desarrollo de distintos desórdenes en la región superior del tracto gastrointestinal (Kuster y col., 2006).

El proceso de colonización se divide en 4 pasos (Fig.8):

- 1) Penetración del microorganismo en el hospedador y adherencia a su nicho específico, exactamente en la superficie de las células epiteliales, de la mucosa gástrica. La colonización inicial depende de la actividad de la enzima ureasa de la bacteria y modulación de la forma celular para penetrar en la mucosa gástrica (Salama y col., 2013).
- 2) La enzima ureasa desdobla la urea con la consiguiente producción localizada de iones amonio, permitiendo la resistencia al ambiente ácido.
- 3) A nivel de la mucosa ocurre el crecimiento y proliferación de la progenie, seguidamente se produce la migración a través de la presencia de flagelos que le permiten penetrar a través

del mucus. Sumado a ello, la enzima ureasa facilita la motilidad ya que induce cambios en las propiedades viscoelásticas de la mucina gástrica.

4) La depleción de mucus, posterior inflamación y muerte de las células epiteliales conduce al daño histológico del epitelio de la mucosa gástrica.

Secuencia de la penetración de *H. pylori* en el tejido gástrico

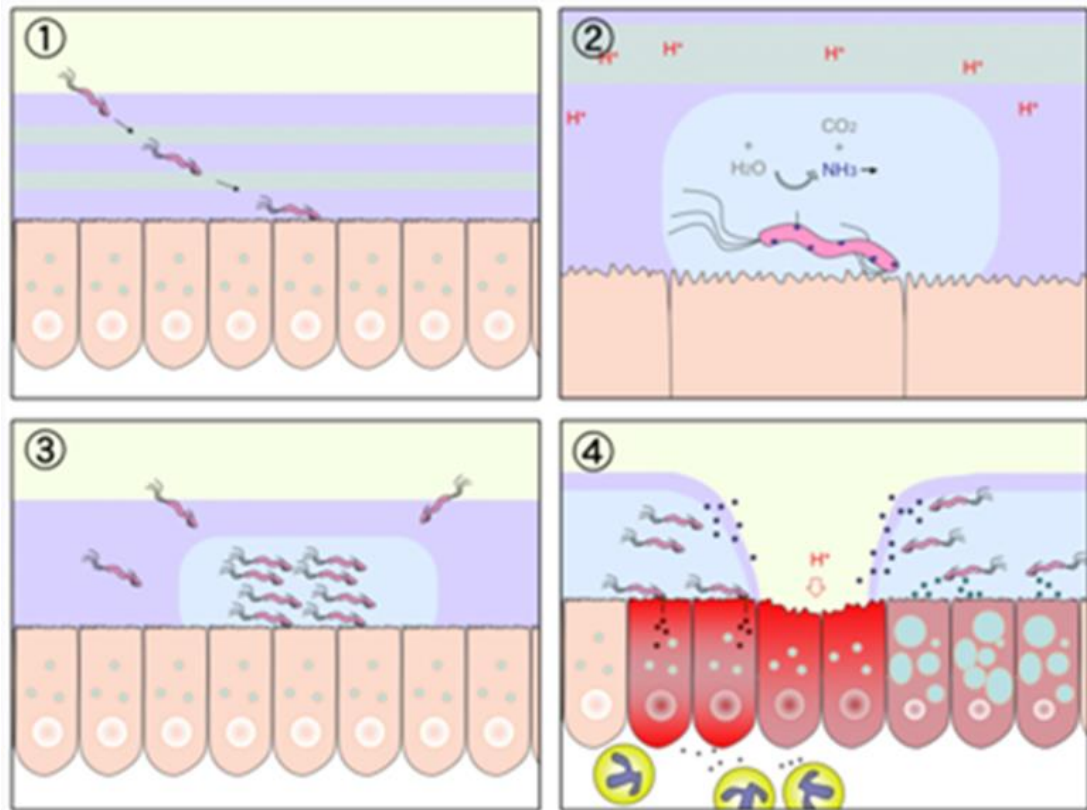


Figura 8: Gráfico ilustrativo de la secuencia de la penetración de *H. pylori* en el tejido gástrico. 1) *H. pylori* se une a las células epiteliales de la mucosa gástrica mediante distintos factores de virulencia. 2) La enzima del microorganismo, ureasa, produce amonio para neutralizar la acidez. 3) Crecimiento y proliferación de *H. pylori*, seguida de la migración a otras zonas de la mucosa. 4) Posterior inflamación y muerte de células epiteliales de la mucosa.

El ADN constitutivo de la bacteria junto con las proteínas de las vías de reparación del material genético, la diversidad del genoma bacteriano y la atenuación de la producción de radicales libres producidos por las células del hospedador son reconocidos como factores esenciales en la persistencia de la bacteria en el nicho.

La bacteria posee la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria del hospedador caracterizada por la síntesis de interleucinas y reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMN) principalmente neutrófilos. También induce cambios morfológicos en las células epiteliales, daños en el ADN de las células epiteliales del hospedador y formación de radicales libres del O₂ (González-Segovia y col., 2008).

La persistencia en el estómago, está fuertemente influenciada por la habilidad que posee el microorganismo de evadir el sistema inmune del hospedador. En la respuesta inmunitaria innata evade distintos receptores, a través de la modificación de blancos y la supresión de transducción de las vías de señalización de reconocimiento. Mientras que, en la respuesta inmunitaria adaptativa, la evasión es debida a la modulación de funciones efectoras de las células T (Salama y col., 2013). *H. pylori* es el agente etiológico de la mayoría de los casos de gastritis crónica, úlcera péptica, metaplasia intestinal y también de algunos tipos de cáncer intestinal (Castillo-Rojas y col., 2004; Kusters y col., 2006) (Fig. 9).

Historia natural de la infección de *H. pylori*

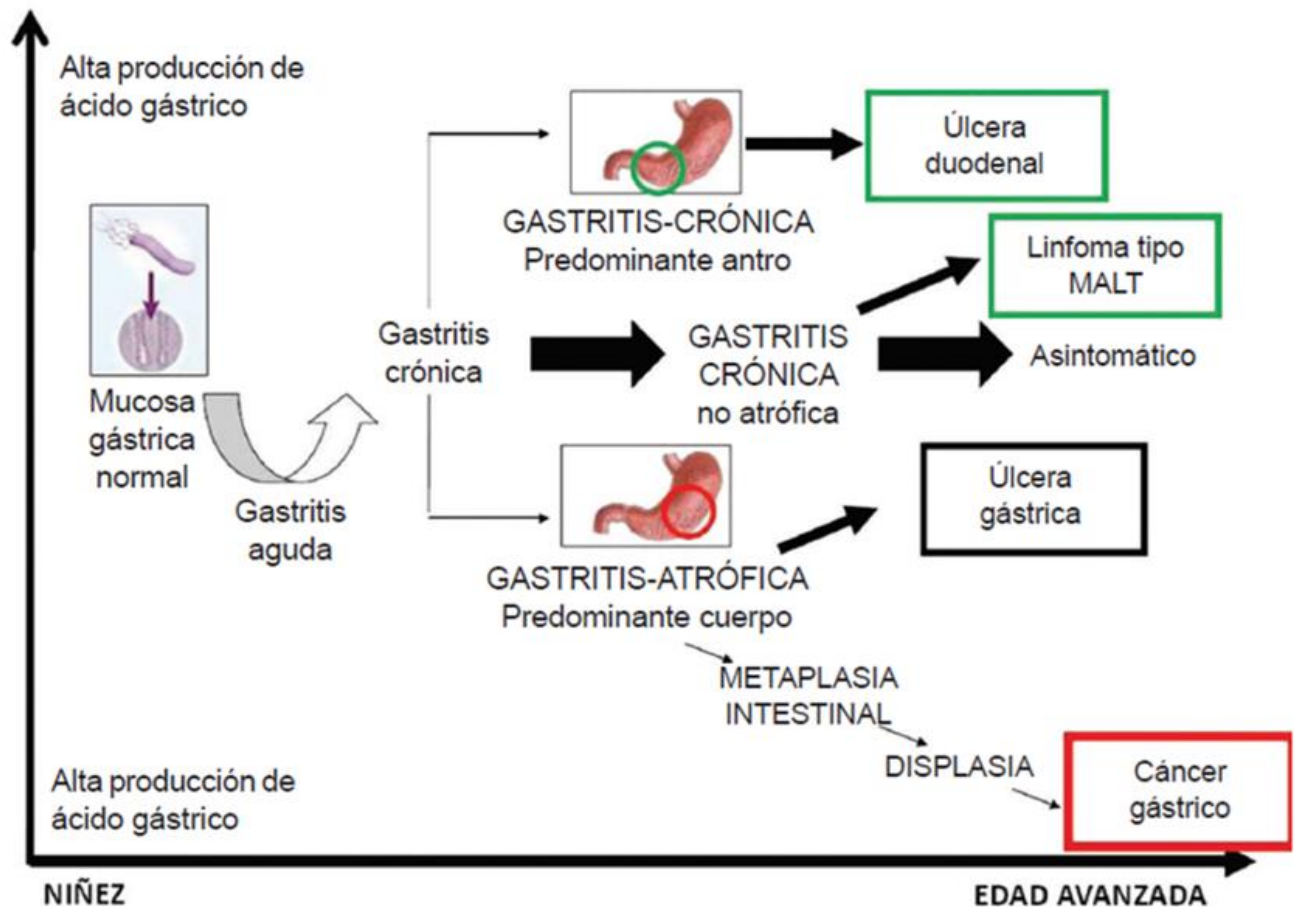


Figura 9: Historia natural de la infección de *H. pylori*. En el esquema se muestra la evolución de la infección de *H. pylori*. El microorganismo llega a la mucosa gástrica, donde induce un cuadro de gastritis aguda. Si persiste en el tiempo, produce cambios a nivel del tejido que conducen a una gastritis crónica. De acuerdo a la región del estómago donde se desarrolla la infección, se producen diferentes patologías. Si el predominio es en la región del antro gástrico, se desarrollan úlceras duodenales; mientras que, si la región afectada es el cuerpo gástrico, se desarrolla metaplasia del tejido que eventualmente conduce a cáncer gástrico. Por otro lado, un cuadro de gastritis crónica no atrófica puede derivar en linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) (Romo González y Coría Jiménez, 2010).

La colonización con *H. pylori* induce una infiltración de la mucosa gástrica con neutrófilos y monocitos, tanto en el antro, como en el cuerpo del estómago. Esto es considerado como una gastritis aguda, el paso inicial para otras patologías resultantes del proceso inflamatorio crónico. La gastritis crónica se caracteriza por persistir en el tiempo y según donde se desarrolle en el estómago humano, muestra una asociación entre la secreción de ácido y la evolución a patologías severas. Si se ubica en el antro gástrico, mantiene la secreción de

ácido y evoluciona a una úlcera duodenal. Mientras que si se ubica en el cuerpo del estómago eventualmente puede evolucionar a úlcera gástrica o desarrollar una pangastritis asociada a una hipoclorhidria. Con el paso del tiempo, la inflamación crónica genera una pérdida de la arquitectura normal de la mucosa gástrica, con destrucción de las glándulas y reemplazo por fibrosis y epitelio del tipo intestinal. Sumado a ello, factores como carcinógenos, factores genéticos del hospedador y factores propios del microorganismo, posibilitan el desarrollo de patologías como úlcera péptica (tanto gástrica como duodenal), gastritis atrófica, linfoma tipo MALT, metaplasia intestinal y cáncer gástrico (Fig.10) (Kuster y col., 2006; Testerman y Morris, 2014).

Distribución de las patologías gástricas asociadas a *H. pylori* en el estómago

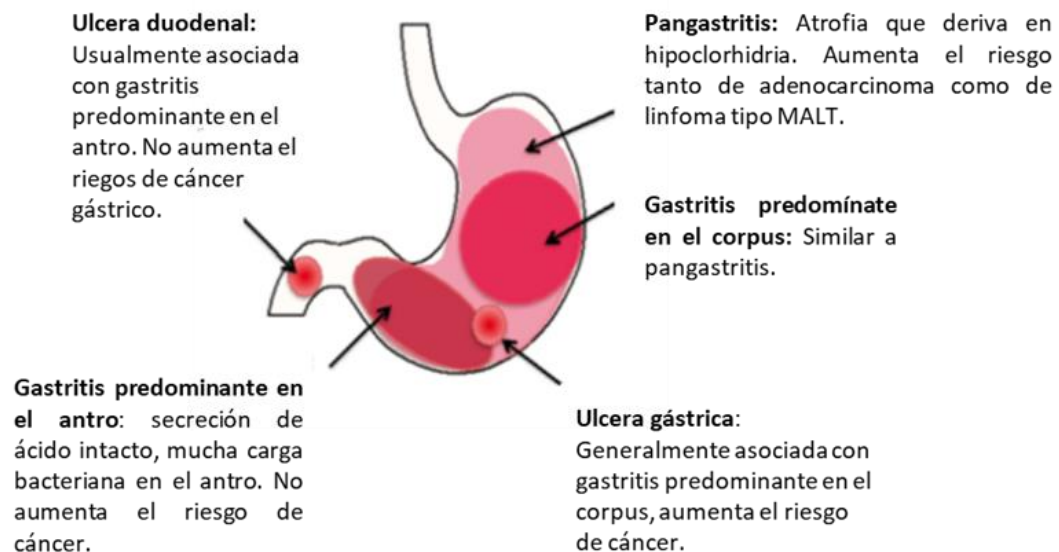


Figura 10: Distribución de las patologías gástricas asociadas a *H. pylori* en el estómago. De acuerdo a la zona del estómago donde ocurre la infección da origen a distintas patologías. La infección en antro favorece al desarrollo de gastritis y/o úlcera duodenal; mientras que la infección en cuerpo induce gastritis, pangastritis y/o úlcera gástrica (Testerman y Morris, 2014).

RESPUESTA INMUNITARIA EN EL ESTÓMAGO

H. pylori y sus productos están directamente relacionados con las células del sistema inmune, generando una fuerte respuesta inmunitaria, con un gran influjo de células inmunes e inducción de una respuesta adaptativa que incluye componentes de las células T helper (Th) 1 y 17. La mayoría de las veces, dicha respuesta no tiene éxito en la eliminación de la infección. De hecho, muchas de las patologías asociadas con este microorganismo son debidas a la actividad constante y sostenida en el tiempo del sistema inmune sumado a la presencia del microorganismo (Kuster y col., 2006; Kivrak Salim y col., 2016; Pagliari y col., 2017).

Una característica de la infección por *H. pylori*, es que existe una inflamación en la mucosa gástrica con predominio de neutrófilos y la marcada infiltración de los mismos, se correlaciona directamente con el daño a nivel del tejido. *H. pylori* utiliza sus factores de virulencia para gatillar el influjo de neutrófilos y activarlos (Allen 2007).

La primera barrera de defensa está formada por la capa de mucus producida por las células epiteliales, epitelio que tapiza toda la superficie del estómago. Por lo que esta barrera estaría formada por la mucosa gástrica y las células del sistema inmune innato que residen debajo de la lámina propia (Kuster y col., 2006; Salama y col., 2013).

También, existen otras clases de receptores, que al unirse a derivados de *H. pylori* disocian la compleja vía de señalización y como consecuencia suprimen la actividad pro-inflamatoria. Esta vía activa NF- κ B y aumenta la transcripción de IL-10, una citoquina con habilidad de suprimir la producción de citoquinas pro-inflamatorias, para mejorar la respuesta de citoquinas anti-inflamatorias (Fig.11) (Salama y col., 2013; Chmiela y Gonciarz, 2017; Sabbagh y col., 2018).

Inmunopatogénesis de *H. pylori*

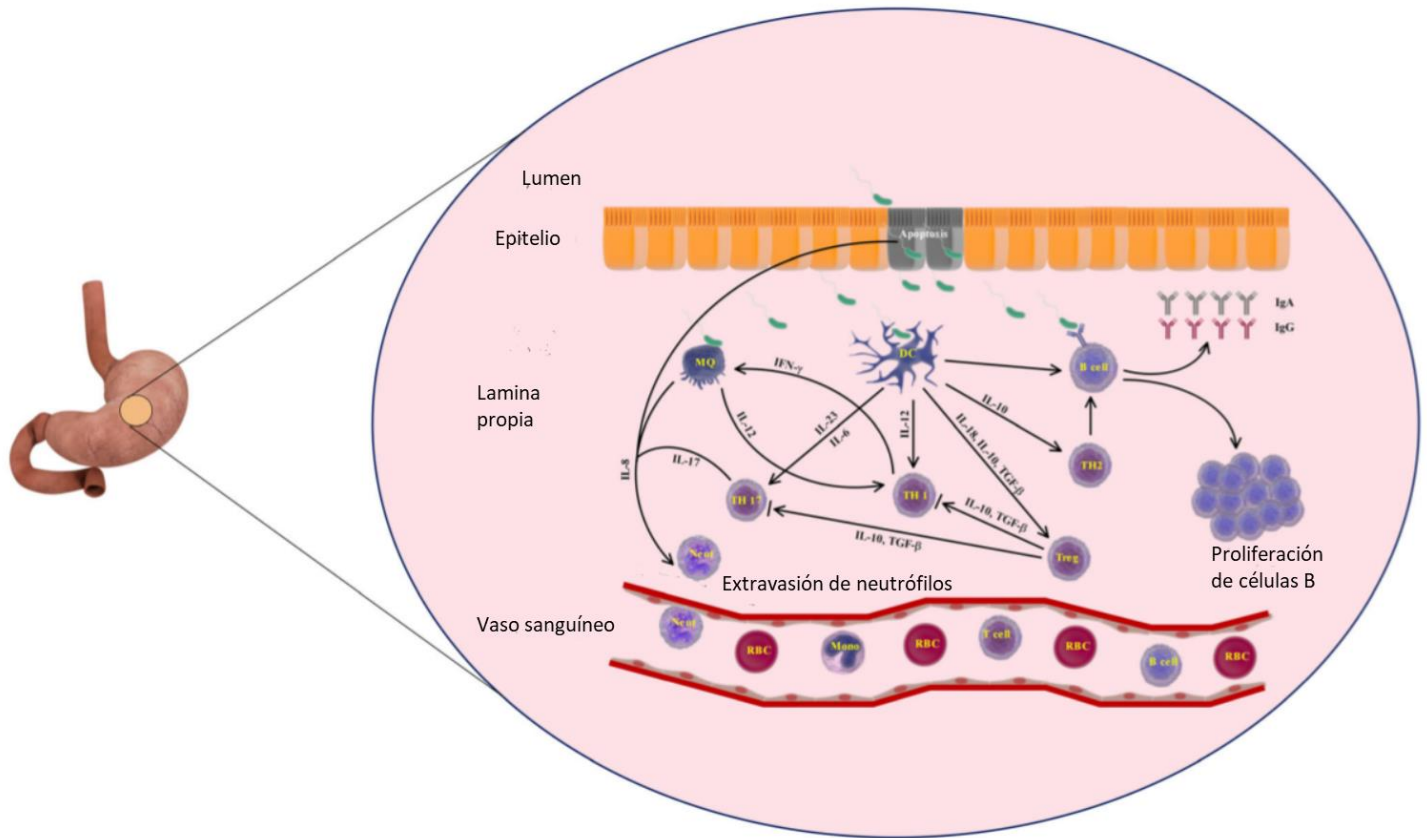


Figura 11: Inmunopatogénesis de *H. pylori*. *H. pylori* coloniza el epitelio gástrico mediante la ureasa. La unión con las células epiteliales resulta en la síntesis de IL-8 y activación de respuesta inmunitaria innata y adaptativa, como así también la apoptosis de células epiteliales. Células dendríticas (CD) capturan, procesan y presentan antígenos bacterianos a células T, las cuales se diferencian en distintos perfiles y sintetizan IL-12, IL-6, IL-23 e IL-17. Esta última actúan sobre las células inmunes innatas y epiteliales para producir IL-8, la cual recluta neutrófilos (Neu). También se induce la síntesis de anticuerpos como IgA e IgG, pero no parecen ser esenciales para la protección (Sabbagh y col., 2018).

Durante la infección por *H. pylori*, las células del sistema inmune junto con las células epiteliales gástricas responden mediante la secreción de citoquinas anti y pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-8 y IL-10), sumadas a la liberación de quimiocinas, interferón y metaloproteasas (MMPs) (Pachathundikandi y col., 2011; Kivrak Salim y col., 2016; Chmiela y col, 2017). Existen dos grupos de respuesta inmune, linfocitos Th1 y Th2, que se distinguen por los perfiles de citoquinas que se liberan. Las citoquinas pro-inflamatorias que participan en la respuesta mediada por Th1 son interleuquina IL-2, IL-12, interferón (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α ; mientras que las citoquinas anti-inflamatorias Th2 son IL-4, IL-6, IL-10 y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β (Velin y Michetti, 2006; Kivrak Salim y col., 2016).

Las células fagocíticas siguen un gradiente quimiotáctico para alcanzar sitios de infección y dicho gradiente es controlado tanto por factores derivados del hospedador como del microorganismo. Por ejemplo, IL-8 actúa como quimiotáctico intermedio, mientras que los factores derivados de la bacteria como quimiotácticos en el estadio final. Al mismo tiempo la unión estrecha entre *H. pylori* y el epitelio gástrico activa la síntesis de T4SS, y transporta hacia el interior de la célula peptidoglicanos (pero no CagA), el cual gatilla la vía de señalización que resulta en la síntesis y secreción de IL-8. La enzima ureasa del microorganismo recluta macrófagos, los cuales sintetizan y liberan IL-1 β , y ésta junto con IL-8 y otros factores del microorganismo estimulan el flujo de neutrófilos hacia el estómago (Fig.12) (Allen 2007).

Atracción y activación de neutrófilos en la infección por *H. pylori*

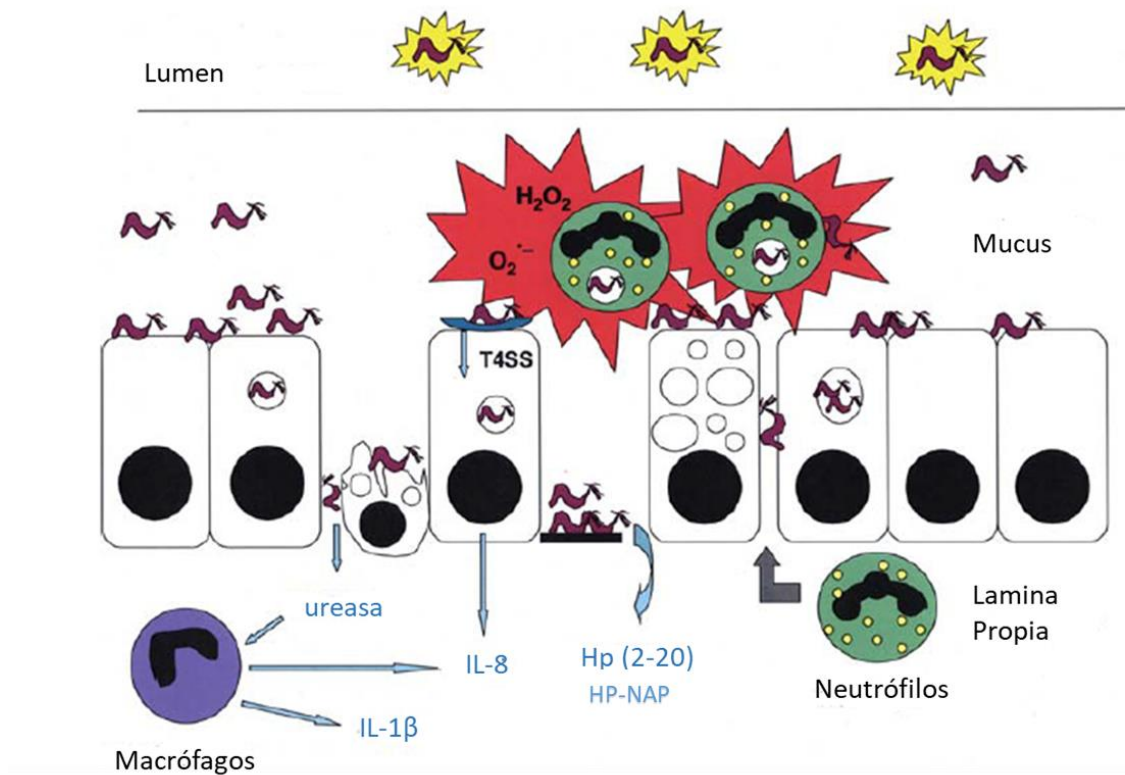


Figura 12: Atracción y activación de neutrófilos en la infección por *H. pylori*. Las bacterias pasan a través del lumen gástrico, se unen al epitelio y el peptidoglicano liberado en el citosol por el sistema de secreción tipo IV (T4SS), desencadenan la síntesis y la secreción de IL-8, mientras que CagA interrumpe las uniones intercelulares. Las bacterias que mueren liberan la ureasa y la proteína activadora de macrófagos (NAP), que recluta este tipo celular. Los macrófagos sintetizan y liberan IL-1 β , que atrae neutrófilos (Allen 2007). Los PMN migran hacia la capa de moco. La fagocitosis activa fuertemente a los neutrófilos, pero el blanco de NADPH oxidasa se interrumpe y los aniones superóxido se liberan en el espacio extracelular. Las bacterias no se eliminan y el daño en los tejidos aumenta con las especies reactivas del oxígeno (EROs).

En las CD, se produce la endocitosis del peptidoglicano a través de T4SS o mediante vía endosómica abriendo la vía para la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y también para la liberación de IL-1 β e IL-18. Dependiendo del perfil de citoquinas que se liberan, se unen a receptores de células T naive, permitiendo la diferenciación de las mismas en células T reguladoras responsables de la tolerancia inmune o en células Th1 o Th17 (Fig.13) (Salama y col., 2013).

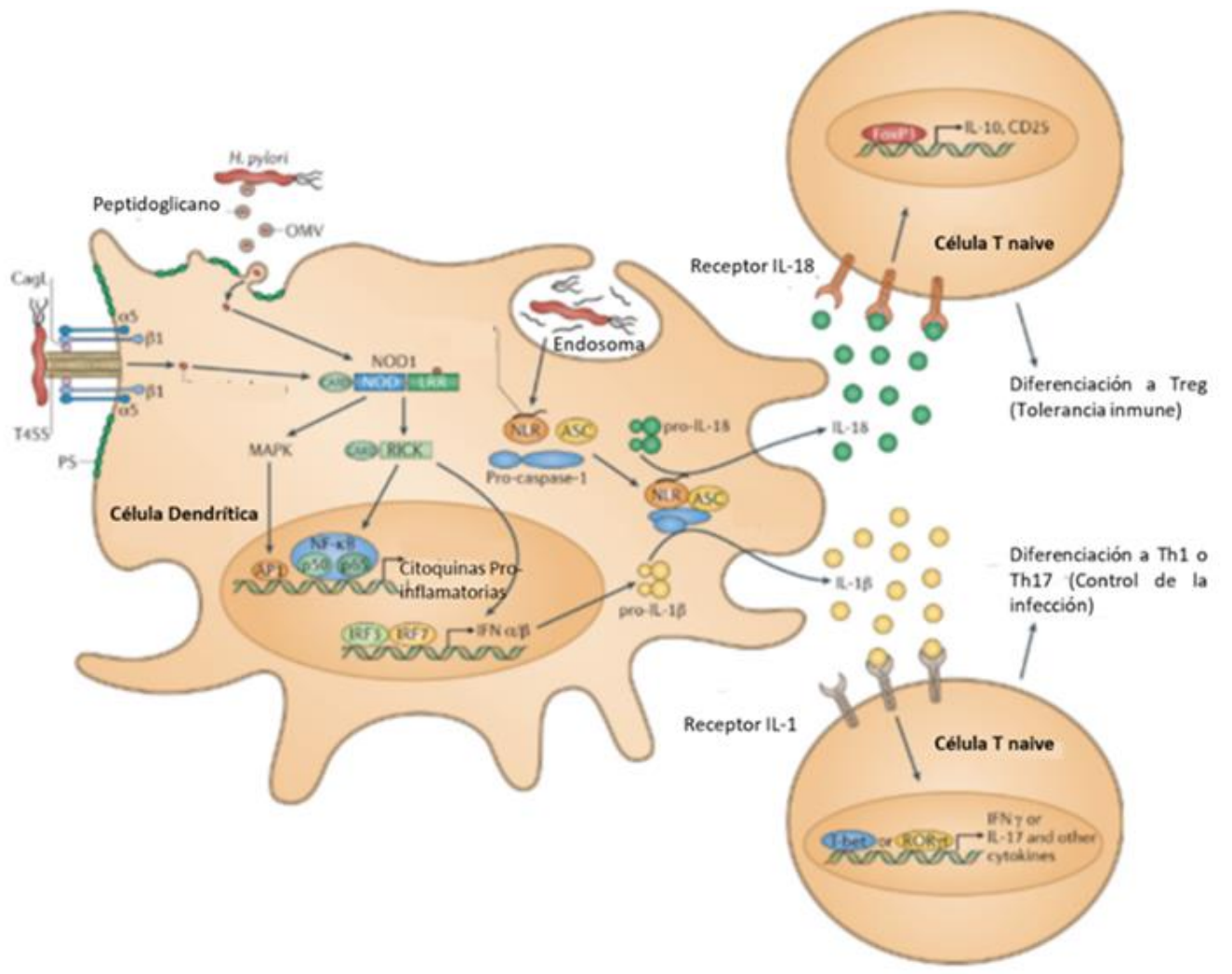


Figura 13: Células dendríticas (CD) en la presentación de antígenos. El peptidoglicano de *H. pylori* ingresa a través del sistema de secreción tipo IV (T4SS) o vía vesículas de membrana externa. Esto interacciona y activa distintas vías, entre ellas induce la expresión del factor de transcripción NF- κ B, el cual regula la expresión de citoquinas proinflamatorias. También, algunos ligandos de *H. pylori* no identificados activan el inflammasoma para inducir el procesamiento y liberación de IL-1 β madura e IL-18. Este último se une a su receptor en células T naive y promueve la diferenciación de T reguladores (Treg) y la tolerancia inmune, que a su vez evita la eliminación y asegura la colonización persistente de *H. pylori*. En contraste, la unión de IL-1 β a su receptor induce la diferenciación de Th1 y Th17 y la expresión de las respectivas citoquinas IFN- γ e IL-17. Abreviaturas: vesículas de membrana externa (OMVs); proteína tipo speck asociada a apoptosis que contiene secuencia carboxi-terminal (ASC); dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD); dominio repetición rica en leucina (LRR); serina / treonina quinasa que interactúa con el receptor (RICK); MAP quinasa (MAPK) (Salama y col., 2013).

Entre las citoquinas importantes se destaca IL-17A (anteriormente referida como IL-17 solamente), producida por células Th17 que actúa como mediador en la defensa inflamatoria del hospedador. Durante la infección por *H. pylori* en humanos se han determinado altas concentraciones de IL-17 en la mucosa gástrica, la cual induce la producción de IL-8 y es acompañado por una gastritis pronunciada (Larussa y col., 2018). IL-8 es una citoquina quimiotáctica que se sintetiza en fases tempranas de la infección por *H. pylori*. La misma induce infiltración de granulocitos al sitio de infección y fagocitosis una vez que estos han arribado. La activación de fagocitos en la zona inflamada podría resultar en un daño en la barrera gástrica debido a la liberación de enzimas proteolíticas y radicales del oxígeno (Chmiela y Gonciarz, 2017).

Adicionalmente TNF- α , proteína de señalización celular, está involucrada en la inflamación sistémica y reacciones de la fase aguda. La misma es producida por macrófagos activos, linfocitos, células natural killers (NK), neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, y neuronas. Forma parte de la regulación de la actividad inmune, inducción de la fiebre, muerte celular mediante apoptosis, inflamación, inhibición de la tumorigénesis y replicación viral. La elevada secreción de este factor induce la apoptosis (Chmiela y Gonciarz, 2017). La síntesis de la misma está estimulada por IL-1 y el mismo TNF- α (Mukhopadhyay y col., 2006). Tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”, se ha visualizado que altos niveles de TNF- α llevan a una exacerbación de la inflamación y respuesta pro-oxidativa, la cual es importante para la patogénesis de muchas enfermedades, especialmente las respiratorias. Dicha inflamación es clave para una cascada de eventos dependientes de TNF- α , en el cual existe una disregulación de leucocitos y linfocitos en los focos inflamados, que llevan a un daño tisular. En enfermedades respiratorias estimula la generación de especies reactivas del oxígeno (EROS), tanto de tejido pulmonar como no pulmonar (células endoteliales y neutrófilos). Durante la generación de EROS, varias moléculas pro-inflamatorias y de adhesión son sintetizadas y a su vez son responsables de varias complicaciones inflamatorias. En síntesis, la inducción de reacciones inflamatorias celulares, estimulan la producción de estrés oxidativo y aumenta la expresión de varias moléculas pro-inflamatorias que en conjunto crean el mecanismo de acción de TNF- α (Fig. 14) (Mukhopadhyay y col., 2006).

Mecanismo de acción de TNF- α

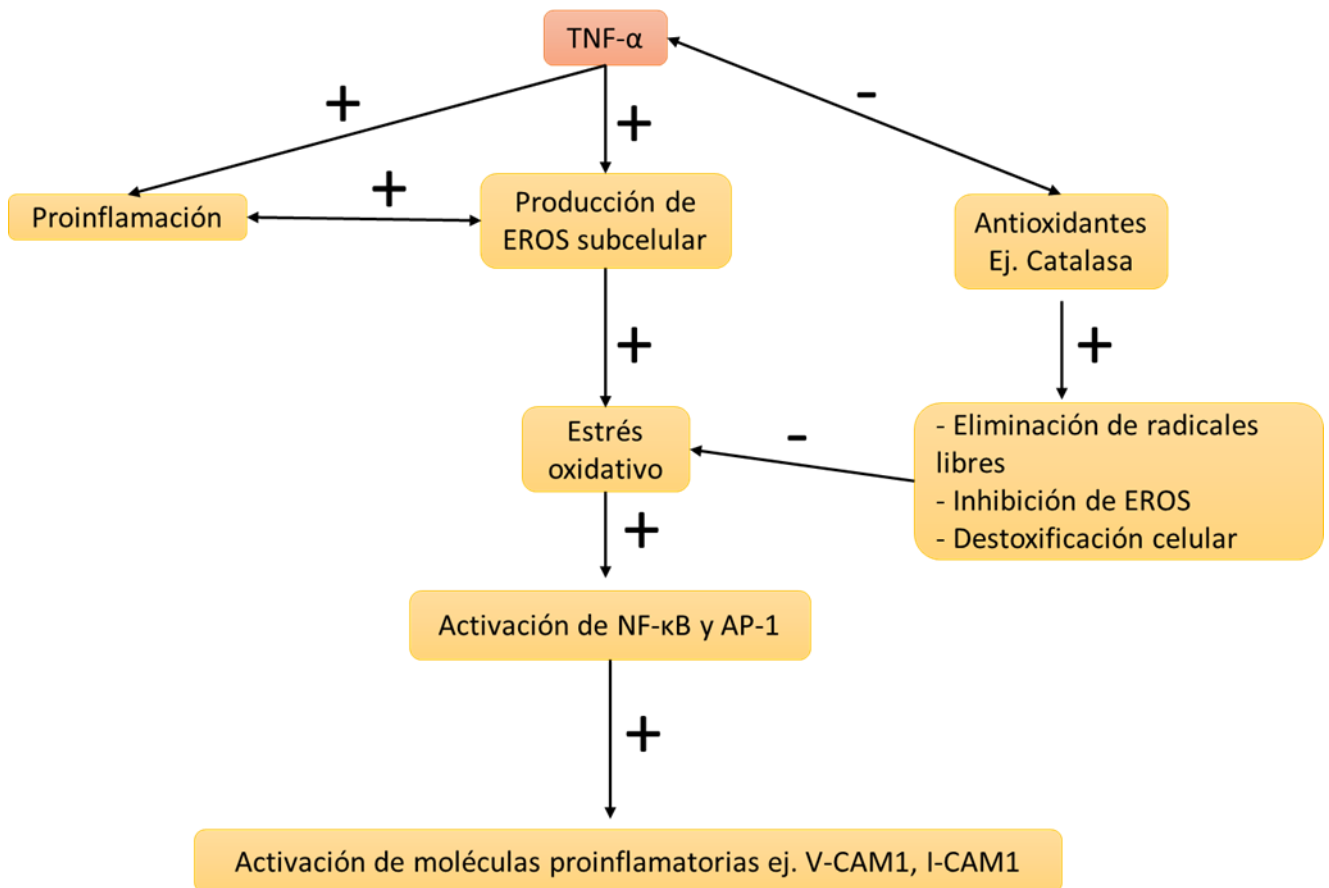


Figura 14: Mecanismo de acción de TNF- α . Mientras que la activación de las especies reactivas del oxígeno (EROS) es dependiente de TNF- α , también aumenta la generación de estrés oxidativo y subsecuente activación del factor nuclear de transcripción kappa-B (NF- κ B), el cual es pro-inflamatorio y pro-oxidativo y activa a la proteína activadora 1 (AP-1). Antioxidantes atenúan el estrés oxidativo y consecuentemente la activación de NF- κ B y AP1. NF- κ B y AP-1 están involucradas en la activación de moléculas pro-inflamatorias como por ejemplo la molécula de adhesión vascular 1 (V-CAM-1) y la molécula de adhesión endotelial (I-CAM1). +: indica activación; -: indica inhibición (Mukhopadhyay y col., 2006).

***H. pylori* y MACRÓFAGOS**

El reclutamiento de células fagocíticas conjuntamente con los mediadores inflamatorios del hospedador contribuyen con la habilidad de la bacteria de producir daño a nivel tisular e inducir gastritis. En vivo, la fagocitosis ocurre en esos sitios dañados produciendo úlceras y regiones de metaplasia. Los macrófagos han demostrado ser efectivos para la fagocitosis de *H. pylori*, observándose que aproximadamente la mitad de la población de la bacteria es internalizada para ser eliminada (Allen y col., 2000). Sin embargo, en la mayoría de los casos este mecanismo de eliminación falla contribuyendo a la persistencia del microorganismo en el tejido gástrico (Borlace y col., 2011). Más aun, se ha propuesto que la internalización del microorganismo en células fagocíticas promoverían altas cargas de *H. pylori* en lugar de eliminarlas (Pagliari y col., 2017).

Los receptores que median la fagocitosis de *H. pylori* todavía no han sido definidos, sin embargo, se sabe que la unión con células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos es multifactorial y está mediada por adhesinas tanto dependientes como independientes de ácido siálico o proteínas de unión a heparán sulfato. También podrían estar involucradas proteínas de matriz extracelular, ya que se ha observado que el microorganismo puede adherirse a laminina, vitronectina, colágeno tipo IV, heparán sulfato y ácido hialurónico (Allen 2007), pero su interacción todavía permanece como una incógnita. Además, *H. pylori* posee una gran variedad de mecanismos de virulencia que permiten evadir la opsonización “*in vivo*”, retardando la fagocitosis e interrumpiendo el tráfico de membrana interno y la maduración del fagosoma (Fig. 15).

Participación de macrófagos en la infección por *H. pylori*

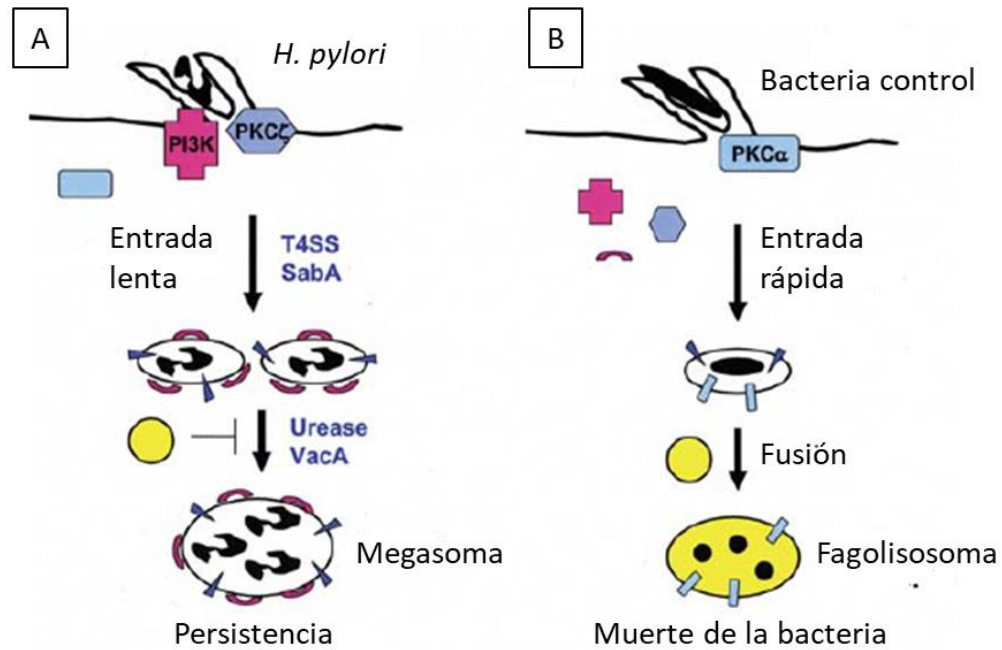


Figura 15: Participación de macrófagos en la infección por *H. pylori*. A) *H. pylori* se une a macrófagos usando factores de virulencia como SabA y T4SS, se fagocita de forma lenta. El amonio derivado de la ureasa y la alta concentración de VacA estimulan la formación del megasoma e inhibe la fusión lisosoma-fagosoma. De esta forma, la bacteria ingerida no es eliminada. B) Normalmente la bacteria es ingerida de forma rápida, se forma el fagosoma, atraviesa el camino endosomal y son degradadas y eliminadas en los fagolisosomas maduros (Allen, 2007).

Una característica distintiva es la composición de la envoltura de las bacterias fagocitadas, las cuales poseen alto contenido de lisofosfolípidos y colesterol glucosilado. *H. pylori* posee una fosfolipasa tipo A de membrana externa, la cual es altamente activa y es estimulada por pH bajo y niveles de lisofosfatidiletanolamina (que pueden exceder el 50% total de fosfolípidos). Sumado a ello, el microorganismo puede adquirir colesterol del medio de cultivo o directamente de la membrana de las células del hospedador y convertirlas en distintos colesteroles α -glucosilados (Allen y col., 2000; Tannaes y Bukholm, 2005; Wunder y col., 2006; Allen 2007).

Luego de que *H. pylori* es fagocitado, reside en fagosomas, y estas organelas forman megasomas, inhibiendo la maduración del fagosoma. De esta forma “se permite” la sobrevivencia, en un nicho intracelular que no es letal para el microorganismo. De hecho, se ha observado que *H. pylori* sobrevive dentro del mismo al menos 24 horas (Allen, 2007; Borlace y col., 2011). El mecanismo que estaría involucrado en esta inhibición no está del todo entendido, pero se cree que el megasoma no es fuertemente ácido y que posee poca cantidad de proteínas de membrana de endosoma tardío LAMP-1. Además, se ha observado que cepas de *H. pylori* que poseen las enzimas ureasa en las cuales el amoníaco derivado de la urea previene la maduración del fagosoma en la infección temprana y de esta manera exagera la actividad de VacA secretada por la batería intrafagosómica. Algunos autores plantean que este mecanismo es el que usa *H. pylori* para sobrevivir dentro de las células epiteliales gástricas (Terebiznik y col., 2006; Allen 2007).

Se ha observado que *H. pylori* genera un único compartimento híbrido fagosoma-endosoma-lisosoma que retiene alguna capacidad degradativa limitada, la cual sería consistente con la persistencia del microorganismo en el hospedador y la sobrevivencia de un número residual del mismo en macrófagos infectados (Borlace y col., 2011).

PATOLOGÍAS EXTRAGÁSTRICAS

En las últimas décadas, diversos autores plantean una asociación de la infección por *H. pylori* en órganos y zonas del cuerpo fuera del área gastroduodenal. El primer reporte fue realizado por Mendall y col. en el año 1994, cuando se asoció la seropositividad de *H. pylori* con enfermedad cardíaca coronaria. Diferentes patologías asociadas al microorganismo incluyen diabetes mellitus, purpura trombocitopénica idiopática, anemia por deficiencia de hierro, fenómeno de Raynaud, migraña, síndrome de Guillen Barré y enfermedades cardiovasculares, del hígado, dermatológicas (rosácea, urticaria idiopática), autoinmunes (tiroiditis), neurológicas y pulmonares (Suzuki y col., 2011; Goni y Franceschi, 2016; de Korwin y col., 2017).

Una de las hipótesis que han surgido para explicar la asociación entre *H. pylori* y éstas patologías, es la respuesta inmunológica causada por esta bacteria en el estómago, que podría generar una respuesta sistémica, no solo causando daños locales, si no también influyendo en el desarrollo clínico de otras enfermedades, fuera del estómago. No obstante, las investigaciones en este campo continúan a los efectos de asegurar esta hipótesis (Lee y col., 2016). Así, para el caso de accidente cerebro vascular se ha planteado que *H. pylori* aumenta la expresión de varios mediadores de la inflamación y activa las plaquetas y factores implicados en la coagulación (Álvarez y Maldonado, 2014).

Zonas extragástricas asociadas con la infección por *H. pylori*

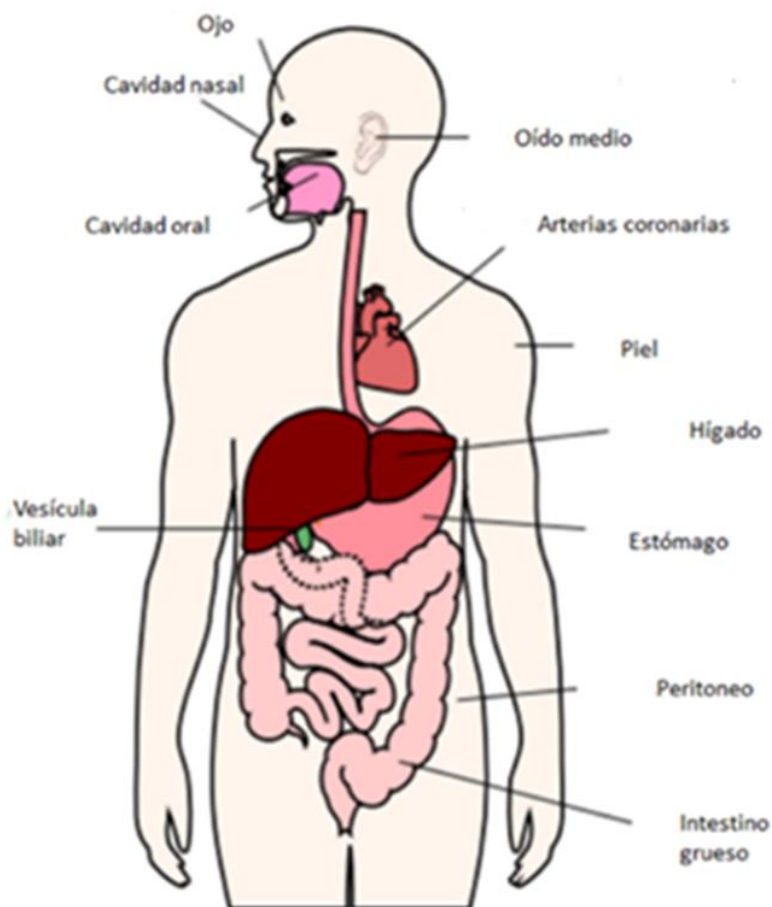


Figura 16: Zonas extragástricas asociadas con la infección por *H. pylori*. En el esquema se muestran los tejidos y órganos extragástricos, que en los últimos años se han asociado a *H. pylori* con un posible rol en el desarrollo de las patologías a nivel de éstas zonas (Testerman y Morris, 2014).

Otra enfermedad neurológica que ha sido asociada a la infección por *H. pylori* es la enfermedad de Alzheimer. La hipótesis para explicar esta asociación es que el microorganismo podría acceder al cerebro a través de una vía oral-nasal-olfativa, lo que lleva a neurodegeneración produciendo una atrofia significativa del bulbo olfativo. Otra hipótesis es que *H. pylori* puede acceder al cerebro a través de monocitos infectados con *H. pylori* a través de la barrera hematoencefálica. Esta teoría se conoce como la "teoría del caballo de Troya"; produce un aumento de la producción de mediadores inflamatorios, como el TNF- α . Situación que puede causar la alteración de la barrera hematoencefálica por la regulación positiva de las metaloproteinasas (Álvarez y Maldonano, 2014). Una tercera hipótesis es que *H. pylori* puede acceder al cerebro a través de una vía neural retrógrada rápida desde el tracto gastrointestinal (GIT) y producir la neurodegeneración.

El mimetismo molecular entre los antígenos de *H. pylori* y los gangliósidos nerviosos periféricos podría ser responsable de la asociación entre la infección por *H. pylori* y el síndrome de Guillen Barré.

Por otro lado, la bacteria fue identificada también en la placa dental, lesiones orales, saliva, amígdalas y tejido adenoide (Momtaz y col., 2012, Ogaya y col., 2015). Sumado a ello, el reflujo gastroesofágico, es un factor de riesgo por el que el contenido gástrico puede fácilmente alcanzar las vías respiratorias y desencadenar un proceso inflamatorio.

Sistema respiratorio

ESTRUCTURA DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

El tracto respiratorio humano puede dividirse en vías aéreas superiores e inferiores. Las vías aéreas superiores incluyen nariz, faringe y laringe, que juegan un rol importante en la eliminación de partículas (Schleimer y col., 2004). Mientras que las vías aéreas inferiores están organizadas como un árbol, comienzan por la tráquea que se ramifica formando los bronquios, que se subdividen numerosas veces y forman los bronquiólos después de varias generaciones sucesivas. Estos últimos se subdividen numerosas veces, hasta que terminan en los alvéolos, los mismos forman parte de la unidad pulmonar terminal (UPT). Esta unidad se encuentra formada por alvéolo, el saco alveolar y el conducto respiratorio (Fig.17), acompañado por un paquete vasculo-nervioso. Junto a los alvéolos se extiende una densa red de capilares, que forman parte de la membrana hemato-aire, permitiendo el intercambio gaseoso. El epitelio alveolar forma una barrera protectora, sin embargo, es una membrana permeable, vulnerable a la entrada de partículas y otros elementos como alergenicos que pueden desencadenar una respuesta inflamatoria. En los humanos el total de la superficie alveolar ocupa aproximadamente 140 m². El parénquima pulmonar está constituido por 86% de espacio aéreo (que incluye alvéolos y conductos) y 13% de septos interalveolares (5% capilares y 7% otros tejidos). La densidad de la superficie alveolar es aproximadamente 370 cm²/cm³ y la densidad de la superficie capilar es de 330 cm²/cm³ (Gerth 1978; Scarpelli 1998; Baharom y col., 2017).

Esquema del sistema respiratorio

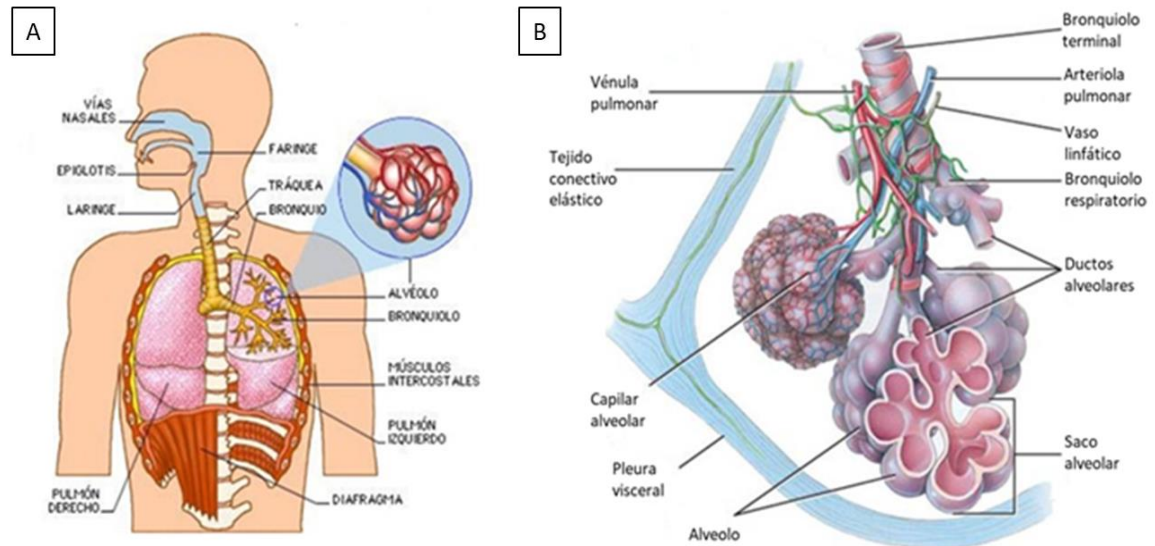


Figura 17: Esquema del sistema respiratorio. A) División del mismo en vías respiratorias superiores e inferiores. **B)** Componentes de la Unidad Pulmonar Terminal (UPT), conformados por alvéolos, saco alveolar y conducto alveolar, acompañado de su paquete neuro-vascular.

PULMÓN

Es un órgano que se encuentra rodeado por la pleura (doble membrana de naturaleza serosa). En su parénquima se encuentran alrededor de 40 tipos celulares diferentes; siendo la mayoría son neumocitos I y neumocitos II (85%) y el porcentaje restante (15%), corresponde a otros tipos celulares, una mezcla de fibroblastos/mioblastos, células endoteliales, pericitos en capilares sanguíneos, macrófagos alveolares, mastocitos, leucocitos, entre otros (Ravelo Rodríguez y col., 2012).

POBLACIÓN CELULAR DEL PULMÓN

La población celular se puede agrupar teniendo en cuenta los tres tejidos en que se divide el tabique: endotelio, epitelio e intersticio. Mientras que el endotelio se encuentra formado por un epitelio simple plano. El epitelio alveolar está compuesto por dos principales tipos celulares; las células epiteliales tipo I o neumocitos tipo I y las células epiteliales tipo II o neumocitos tipo II (Gerth y col., 1978).

γ **Células alveolares I o neumocitos tipo I (AECI):** Se encuentran cubriendo el 95% de la superficie alveolar y poseen un diámetro de aproximadamente 50-100 μm . Su morfología es elongada y plana, similar a las células endoteliales, su citoplasma se extiende desde la región perinuclear y además poseen un núcleo que sobresale por encima de la superficie epitelial. Expresan diversas proteínas como aquaporina 5, un canal funcional de intercambio de iones, caveolinas, receptores de adenosinas y posee múltiples genes de resistencia a drogas. Poseen organelas próximas al núcleo central y en la parte periférica vesículas de micropinocitosis, como microtúbulos y microfilamentos. Entre sus funciones se encuentra el intercambio gaseoso, permeabilidad y regulación de la homeostasis del fluido alveolar. Su proporción en el alvéolo es de 40%, mientras que los neumocitos II se encuentran en un porcentaje de alrededor del 60% (Gerth y col., 1978; Chen y col 2004; Herzog y col., 2008; Ravelo Rodríguez y col., 2012) (Fig. 18).

γ **Células alveolares II o neumocitos tipo II (AECII):** Se encuentran ubicados en la curvatura de los alvéolos en mamíferos y son responsables de producir el surfactante pulmonar para mantener la tensión superficial. Las mismas poseen una forma redondeada a cúbica y en su región apical presentan algunas microvellosidades. Tienen un núcleo central redondo, grandes cantidades de citoqueratina, aparato de Golgi muy desarrollado y numerosas mitocondrias. En el citoplasma es característica la presencia de cuerpos laminares que derivan de cuerpos multivesiculares con contenido denso y laminar, estructuras que poseen grandes cantidades de fosfolípidos. La principal función es la de intervenir en la síntesis del surfactante pulmonar, cuyo principal componente es la dipalmitilfosfatidilcolina. Otras funciones son mantener el espacio alveolar libre de fluidos, el transporte de sodio, ser progenitor de neumocitos tipo I, para reparar el daño epitelial después de un daño al tejido o durante el desarrollo embrionario. Además, juegan un rol en la defensa del hospedador por medio de la producción de citoquinas y factores de crecimiento que afectan las células del sistema inmune. Estas células expresan antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHCII), pero su habilidad de presentar antígenos todavía está en estudio (Gehr y col., 1978; Herzog y col., 2008; Ravelo Rodríguez y col., 2012) (Fig. 18).

γ **Fibroblastos:** constituyen el 30-40% de la población celular del parénquima del pulmón adulto sano. Si bien sintetizan muy poca matriz, los miofibroblastos activos producen

matriz responsable de generar fibrosis en un proceso patológico en el pulmón. Además, se observa la presencia de pericitos en la pared capilar (Gerth y col., 1978; Herzog y col., 2008) (Fig. 18).

γ **Macrófagos alveolares (MA):** son células que se encuentran frecuentemente unidas a la superficie epitelial del pulmón humano por medio de filopodios, embebidos en la capa de revestimiento de la superficie (Gerth y col., 1978). Son las defensas inmunes iniciales, reciclan el surfactante y materiales extraños, sintetizan péptidos con propiedades antibacterianas, para asegurar que los pulmones estén libres de cualquier elemento extraño (Camberlein y col., 2015). Los MA poseen capacidad proliferativa propia, pero también pueden ser reemplazados a partir de monocitos provenientes de la médula ósea (Baharom y col., 2017). Son pobres inductores de células T a través de la presentación de antígenos (Fig. 18).

Tipos celulares presentes en el estroma pulmonar

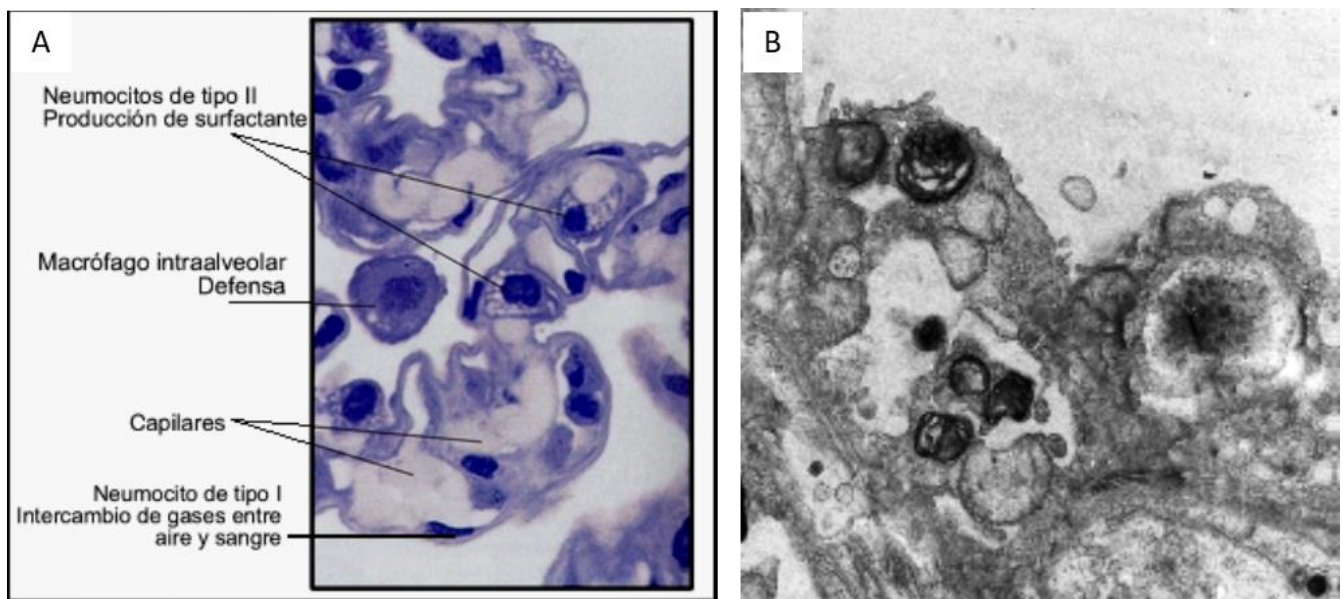


Figura 18: Tipos celulares presentes en el estroma pulmonar. A) Presencia de macrófagos alveolares, neumocitos tipo I y II. B) Fotografía electrónica de neumocitos tipo II con sus características estructuras llamadas cuerpos multilaminares que contienen principalmente dipalmitoil-fosfatidilcolina (Ravelo Rodríguez y col., 2012).

SURFACTANTE PULMONAR

El surfactante pulmonar es depositado mediante el proceso de exocitosis en la luz del alvéolo por parte de los neumocitos tipo II. En un primer momento se forma un complejo proteico denominada mielina tubular, que se ensambla en estructuras tubulares, incorporándose a la sustancia tensoactiva según las necesidades fisiológicas, formando una monocapa sobre la superficie del alvéolo.

El surfactante es una mezcla compuesta en un 80-90% por fosfolípidos (principalmente dipalmitoilfosfatidilcolina) y colesterol, más un 10% de proteínas. Su función principal es reducir la tensión superficial de la interface aire-agua, disminuyendo de esta forma el trabajo necesario para expandir el pulmón y prevenir el colapso de los alvéolos al final de la inspiración. La segunda función principal es la de defensa, ya que también participa en la regulación del pH y la concentración de calcio, transmitiendo la señal inflamatoria del alvéolo al capilar adyacente. También, favorece la coagulación, fibrinólisis y la protección del parénquima pulmonar contra patógenos, ya que varios de los productos tienen propiedades bactericidas que actúan mediante la opsonización, siendo eliminados posteriormente los microorganismos por los MA (Ravelo Rodríguez y col., 2012; Ishii y col., 2014; Stachowicz-Kúsnierz y col., 2018).

UNIDAD PULMONAR TERMINAL (UPT)

La UPT constituye una estructura formada por alvéolos organizados que se abren desde el espacio aéreo y se conecta con los bronquiolos respiratorios, ductos alveolares y sacos alveolares. Se encuentra cubierto por una fina capa de líquido conformado por una película monomolecular de surfactante, en la interfaz abierta gas-líquido. Los conductos alveolares aumentan en número mediante la ramificación repetitiva de los bronquiolos, a través de seis a 12 generaciones en los acinos humanos. Por último, la estructura recubre a la unidad se llama saco alveolar (Scardapelli, 1998).

Además, presenta una red de tejido conectivo en el espacio intersticial, extendiéndose desde la región subpleural hasta el hilio. Este tejido le imparte propiedades elásticas, tal vez viscoelásticas, al tejido pulmonar. Los capilares, los vasos sanguíneos precapilares y

poscapilares, los linfáticos y las células migratorias también comparten el intersticio (Scardapelli, 1998).

RESPUESTA INFLAMATORIA DEL ESTROMA PULMONAR

Ciertas enfermedades pulmonares, por ejemplo, enfisema, causa pérdida de neumocitos I e hiperplasia de los neumocitos II. Estas últimas células tienen alteradas la expresión de sus componentes y productos, como así también la capacidad de diferenciarse entre las poblaciones celulares, lo que lleva a un estado de vulnerabilidad de los alvéolos.

La lesión aguda pulmonar o síndrome de distrés respiratorio agudo del adulto (SDRA), se caracteriza por un daño endotelial y epitelial, activación de mecanismo inflamatorio, desbalance entre citoquinas pro y anti-inflamatorias, necrosis y apoptosis celular. Sumado a cambios morfológicos a medida que transcurre el tiempo: en la primera semana se observa una fase exudativa, donde se produce una lesión como respuesta inflamatoria de las células epiteliales alveolares, aumento de la permeabilidad endotelial y extravasación de líquido a la luz alveolar, causando edema en el intersticio alvéolo-capilar, alterando el surfactante pulmonar y generando un colapso alveolar y posible depósito de sustancias inflamatorias. Aproximadamente a los 20 días, se observa una fase proliferativa, donde hay aumento del número de los AECII, cubriendo toda la superficie alveolar. El colágeno se deposita en el intersticio, al tiempo que disminuye el tamaño de los alvéolos y los separa, produciéndose una fibrosis pulmonar. La última fase se la denomina fase fibrótica, debido a la actividad fibroblástica, en donde también se considera que la apoptosis de células epiteliales alveolares y el retardo en la reparación del epitelio juegan un rol importante, situación que es mediada por vías de señalización de transmisión mesenquimal (Ravelo Rodríguez y col., 2012; Cabrera-Benítez y col., 2012).

Patologías como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), que es una enfermedad intersticial del pulmón que causa una destrucción y pérdida de función del órgano de forma progresiva e irreversible. Se ven caracterizadas por un cambio fenotípico y funcional de las AECII como disfunción mitocondrial o senescencia y la liberación de mediadores pro-inflamatorios como IL-1 β , o Factor de crecimiento transformante(TGF)- β . A nivel del tejido hay fibrosis subpleural y paraseptal (espacios aéreos revestidos por epitelio bronquial quístico, a menudo

llenos por mucina y variable números de células inflamatorias), alternando con áreas menos afectadas o parénquima normal (King TE y col., 2011; Lehman y col., 2018).

Además, muchas bacterias patógenas pueden llegar a la nasofaringe mediante la microaspiración, donde el desarrollo de cuadros infecciosos va a depender del número de bacterias que se encuentran en el pulmón, su virulencia y la habilidad del hospedador para eliminar al microorganismo invasor (Camberlein y col., 2015). Diversos patógenos se han asociado con enfermedades pulmonares como por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, entre otros. Muchos de ellos son transferidos desde el bronquio a los pulmones, donde colonizan el lumen de los alvéolos y células epiteliales alveolares.

S. aureus, luego de su infección, es expuesta al surfactante pulmonar, el cual es rico en lípidos. Cuando las bacterias se encuentran con este ambiente rico en lípidos, es probable que diferentes respuestas sean inducidas. Éstas mismas son distintivas de los microorganismos que circulan en el torrente sanguíneo o que infectan el tejido, lo que puede contribuir a la virulencia en el hospedador (Ishii y col., 2014).

H. influenzae causa bronquitis, neumonía, enfermedades respiratorias crónicas secundarias y se lo ha aislado de pacientes con enfermedad obstructiva crónica pulmonar (EPOC), tanto en fase aguda como en exacerbaciones (Abdillahi y col., 2018).

La infección por *S. pneumoniae* en el pulmón produce un influjo masivo de PMN en los espacios alveolares, que cuando la inflamación es pobremente controlada, se produce destrucción del tejido, obstrucción del intercambio gaseoso y en última instancia pérdida de la función respiratoria (Bhowmick y col., 2013).

Helicobacter pylori y pulmón

La capacidad de *H. pylori* para alcanzar la vía respiratoria junto a la similitud existente entre la bronquiectasia y la ulcerogénesis podrían explicar la relación de esta bacteria con las enfermedades respiratorias. En ese sentido, en la ulcerogénesis producida por el microorganismo, se observa un gran reclutamiento de neutrófilos y linfocitos T en la submucosa, además de la liberación de IL-8, IL-1 y TNF- α , lo que permite plantear la hipótesis de un posible papel patogénico del microorganismo en las vías respiratorias.

El mecanismo que relaciona la infección por *H. pylori* en el desarrollo de enfermedades respiratorias no está del todo dilucidado. Aunque existen tres teorías que podrían explicar esto, y consecuentemente, el posible mecanismo de infección de *H. pylori* en la patogénesis de la mayoría de las enfermedades extragástricas incluyendo inflamación crónica, local o sistémica y la iniciación de la respuesta autoinmune (Chmiela y Gonciarz, 2017). Las teorías son:

1) La respuesta inmune inducida por *H. pylori*. La liberación crónica de péptidos gastrointestinales (gastrina, somatostatina) y citoquinas proinflamatorias incluyendo IL-1, IL-8 y TNF- α desde la mucosa gástrica, tienen como consecuencia un efecto sistémico (Roussos y col., 2006; Testerman y Morris, 2014) (Fig.19).

Efectos sistémicos de la respuesta inflamatoria a la infección por *H. pylori*

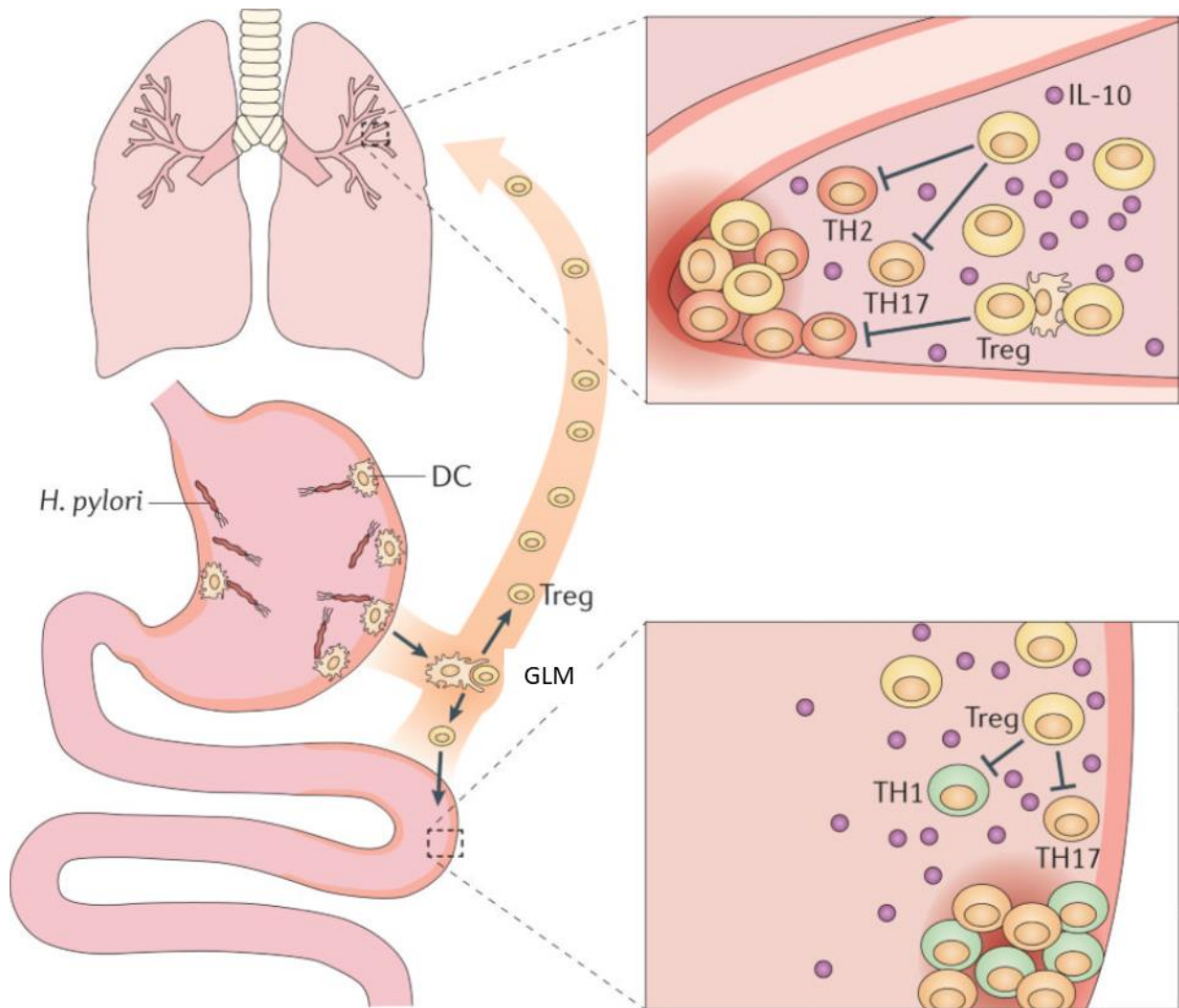


Figura 19: Efecto sistémico de la respuesta inflamatoria a la infección por *H. pylori*. Este efecto se manifestaría en distintos sistemas como el tracto intestinal o las vías respiratorias. Las células dendríticas del tejido (CD) toman muestra de los antígenos de *H. pylori* en la mucosa gástrica y migran posteriormente a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y de drenaje del estómago, donde estimulan la respuesta de células T reguladoras (Treg). Los antígenos solubles pueden ser transportados a través de la linfa a los GLM para su presentación por CD residentes. Las células Treg entran en circulación y se acumulan, no solo en la mucosa gástrica, sino también en otras superficies mucosas del cuerpo, tales como las vías respiratorias y el intestino. Los efectos “patógenos” de las células T sería a través de mediadores solubles como IL-10 y mecanismos dependientes de contacto (Testerman y Morris, 2014).

2) Mimetización molecular. Es una estrategia muy común de agentes infecciosos que se adaptan al organismo hospedador para evadir la respuesta inmune. Se la define como una similitud antigénica y funcional entre estructuras microbianas y moléculas del hospedador que lleva a la producción de anticuerpos autoreactivos, que podrían contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes. De esta forma, una mimetización molecular cruzada entre antígenos de la bacteria y el hospedador podrían existir en pacientes infectados con *H. pylori*. Esta hipótesis es respaldada porque se han visualizado, en pacientes infectados, anticuerpos con reactividad a la zona antral de la mucosa gástrica. El rol patogénico de este microorganismo en las enfermedades podría deberse a una activación anormal de mediadores inflamatorios y/o a la inducción de autoinmunidad (Fig. 20) (Roussos y col., 2006; Malfertheiner y col., 2011; Chmiela y Gonciarz, 2017).

Mimetismo molecular entre *H. pylori* y componentes del hospedador

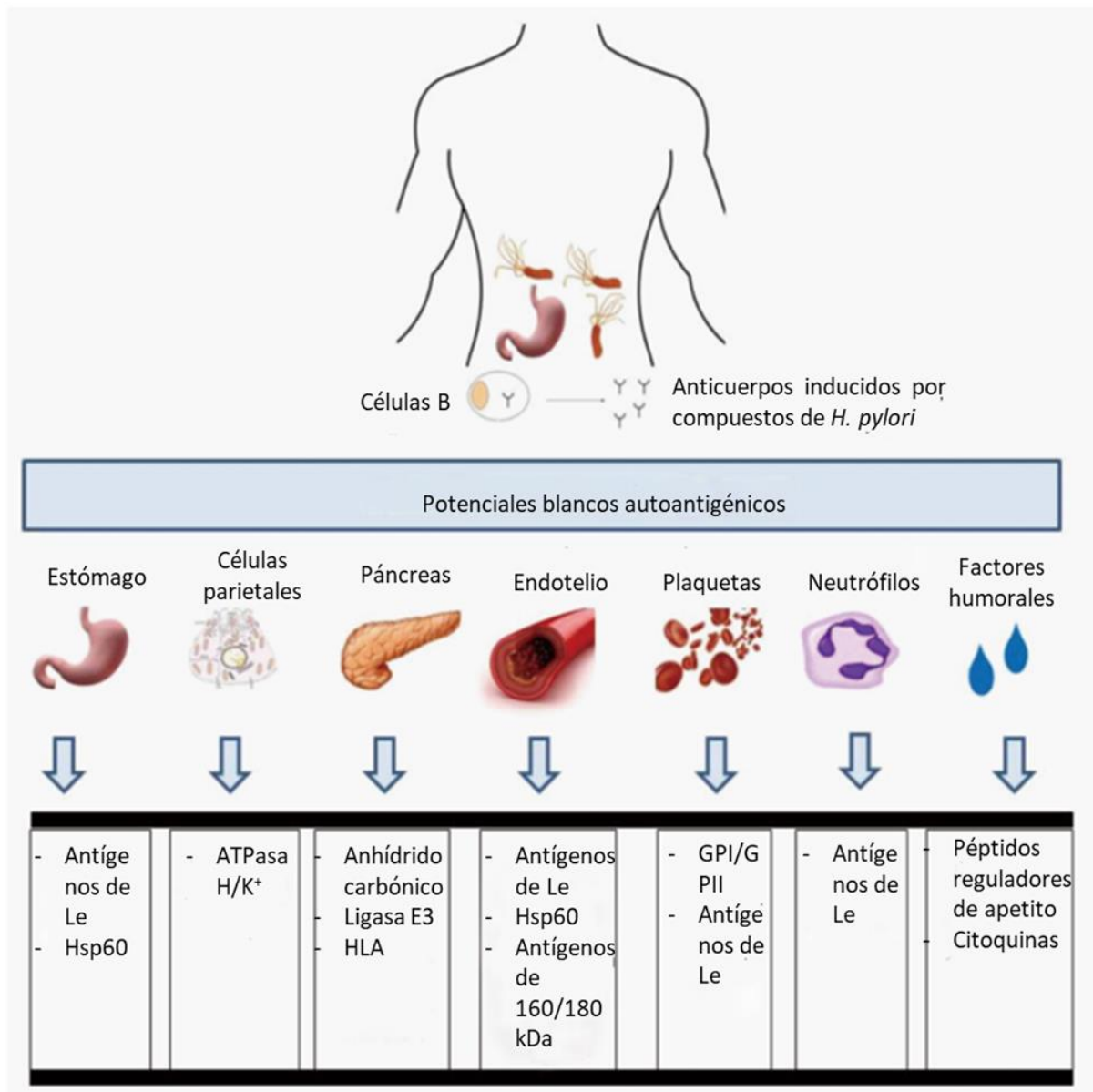


Figura 20: Mimetismo molecular entre *H. pylori* y componentes del hospedador. La exposición crónica del sistema inmune del hospedador a los componentes *H. pylori* que poseen secuencias homólogas con componentes celulares o solubles del hospedador podría inducir anticuerpos autoinmunes. Se muestran ejemplos de los blancos del hospedador inducidos por *H. pylori*. GP: glucoproteínas; Hsp: proteínas de choque térmico, HLA: antígenos humanos leucocitarios, Le: antígenos de Lewis (Chmiela y Gonciarz, 2017).

3) La aspiración o inhalación de la bacteria en las vías respiratorias. El contenido gástrico puede alcanzar fácilmente las vías respiratorias a través del reflujo gastroesofágico, que es un fenómeno fisiológico. Si *H. pylori* está presente en el mismo, podría colonizar el sistema respiratorio a través de una ruta oral-faríngea-laríngea. Esto causaría un daño directo y una inflamación crónica de dichas vías, facilitado por el mismo origen embriológico del sistema digestivo y respiratorio (Fig. 21) (Deng y col., 2013; Samareh Fekri y col., 2014; Chmiela y Gonciarz, 2017).

Aspiración directa de *H. pylori* en las vías respiratorias

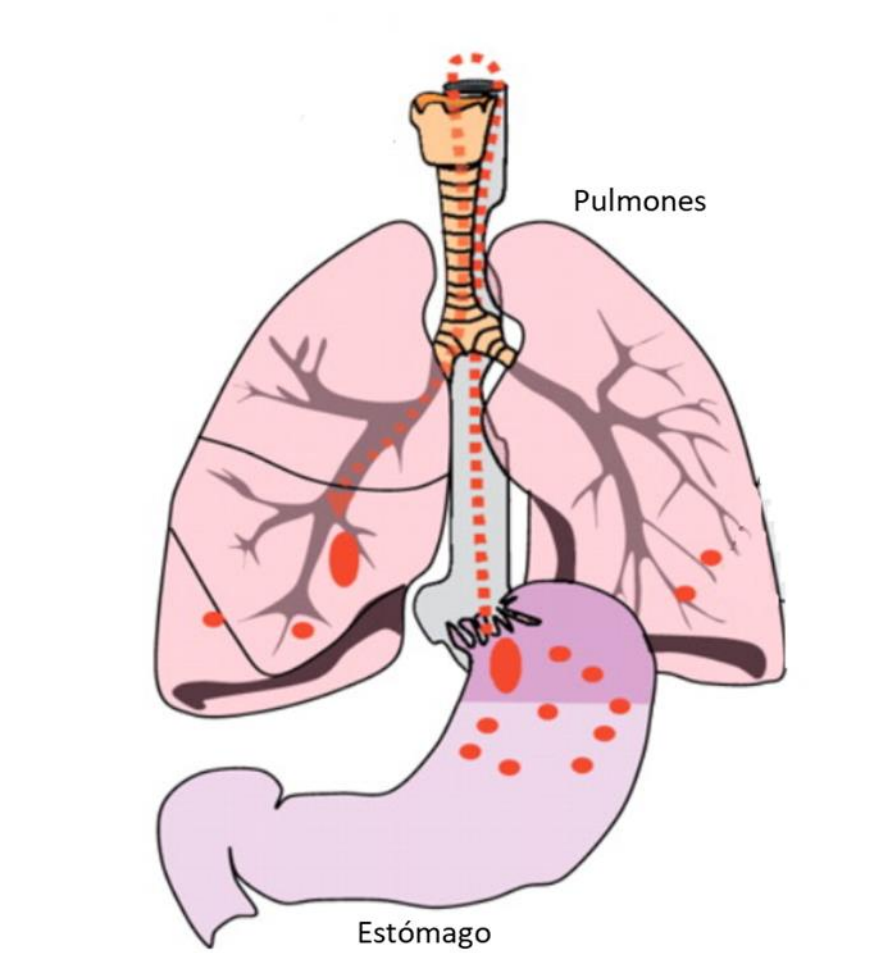


Figura 21: Aspiración directa de *H. pylori* en las vías respiratorias. El pasaje del contenido del estómago, donde se encuentra *H. pylori*, hacia el esófago, posibilita la llegada al pulmón y permite la instalación del microorganismo en el parénquima pulmonar.

En cuanto a las enfermedades respiratorias, un aumento de la seroprevalencia de *H. pylori* se ha encontrado en las bronquiectasias activas, la bronquitis crónica y la tuberculosis pulmonar activa (Angrill y col., 2006). Además, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la tuberculosis pulmonar son más frecuentes en pacientes con úlcera péptica que en la población en general (Shams-Hosseini y col., 2011; Tabaru y col., 2012). En este sentido, los pulmones comparten el mismo origen embriológico (endodermo) con la túnica mucosa del estómago, la cual secreta gastrina entre sus productos principales.

Otro antecedente propone que *H. pylori* es una posible causa de muerte súbita en niños, demostrando la presencia del microorganismo en estómago, tráquea y pulmón (Kerr y col., 2000).

Estudios realizados en pacientes con cáncer de pulmón mostraron una prevalencia del 73% de anticuerpos anti-*Helicobacter* en enfermos con esta patología (Malfertheiner y col., 2011). El mecanismo propuesto por Nakashima y col. (2015) plantea que la infección por el microorganismo no sería responsable directo de las enfermedades pulmonares, si no debido a la aspiración en el pulmón de exotoxinas como VacA, producidas por el microorganismo.

Teniendo en cuenta que la prevalencia de cáncer de pulmón es 2 a 3 veces mayor en pacientes con úlceras gástricas, se ha sugerido que la prolongada liberación de gastrina y ciclooxigenasa (COX)-2 en pacientes infectados con *H. pylori* podría estimular la neoangiogénesis del tumor y por lo tanto el desarrollo del cáncer de este órgano (Deng y col., 2013).

Sin embargo y aún observándose una alta seroprevalencia de *H. pylori* en pacientes con diferentes enfermedades respiratorias, esto no ha sido aún estudiado (Angrill y col., 2006; Aebischer y col., 2010; Nakashima y col., 2015). Por otro lado, el microorganismo podría afectar a los pulmones a través del LPS estimulando la producción de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-1, IL-6 y TNF- α (Malfertheiner y col., 2011). Además, la persistencia de *H. pylori* en el estómago conduce a la inflamación crónica y mantiene la estimulación del sistema inmune, lo cual podría contribuir a las enfermedades respiratorias (Koshiol y col., 2012; Moyat y Velin 2014).

Las infecciones respiratorias provocan extensas lesiones que generan cambios en la arquitectura pulmonar (Sacco y col., 2004). Durante los desórdenes inflamatorios, llegan a producirse en el epitelio desprendimientos de células dañadas, tanto del lumen bronquial como alveolar, pero, además se lleva a cabo la activación de células sobrevivientes. Las células sobrevivientes incrementan la expresión de moléculas de adhesión de superficie, como la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas (Sacco y col., 2004). Como resultado se produce un reclutamiento de células inflamatorias, tales como neutrófilos y macrófagos, quienes pueden liberar especies reactivas del oxígeno, del nitrógeno y citoquinas que llevan a la inflamación del tejido pulmonar (Kumar y col., 2003). El resultado del desbalance entre oxidantes/antioxidantes produce estrés oxidativo. Éste juega un rol importante en la patogénesis de las enfermedades del pulmón, no sólo a través del daño directo, sino también por estar implicado en el control de los mecanismos inflamatorios pulmonares (MacNee., 2000). Ácidos grasos libres y lípidos poli-insaturados de las membranas celulares son el mayor blanco del ataque por radicales libres, resultando en un aumento de la peroxidación lipídica. Durante el estrés oxidativo se produce un aumento en la expresión de genes pro-inflamatorios como IL-1, IL-8, TNF- α situación que ocurre debido a la activación del NF- κ B, por efecto de los oxidantes (MacNee., 2000; Donaldson y col., 2003).

Los macrófagos juegan un rol importante, tanto en la eliminación de patógenos como en iniciar la respuesta inmune, ya que secretan enzimas, citoquinas, quimiocinas y especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Por otro lado, macrófagos y neutrófilos activados por citoquinas pro-inflamatorias producen grandes cantidades de superóxido y sus derivados a través de la vía NADPH oxidasa (Droge, 2002). La NADPH oxidasa de los fagocitos genera anión superóxido (O_2^-), reacciones posteriores producen peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y otros productos microbicidas, ya sea en el espacio extracelular o en la vacuola fagocítica ejerciendo efectos tóxicos (Cornejo y col., 2000). Las quimiocinas juegan un rol central en la migración y activación celular, debido a que son capaces de atraer leucocitos inflamatorios (tales como monocitos, células T activadas y neutrófilos) (Campbell y Butcher, 2000). La proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-2 y la quimiocina derivada de queratinocito (KC), similares a IL-8 en humanos, atraen neutrófilos al sitio de inflamación

(Yamamoto y col., 2004; Speyer y col., 2004), mientras que macrófagos y monocitos son atraídos por la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1 y MIP-1 α (Speyer y col., 2004).

Los neutrófilos, monocitos y macrófagos, cooperan durante el inicio, progresión y resolución de los procesos inflamatorios (Soehnlein y Lindbom, 2010). En este sentido, la prolongación de la supervivencia de los macrófagos puede jugar un papel fundamental en determinadas situaciones, permitiendo una correcta resolución de la inflamación y evitando la aparición de procesos inflamatorios crónicos (Filep y El Kebir, 2009). En el pulmón, el efecto protector de COX-2 en injurias parece ser mediadas, al menos en parte, por lipoxinas (Fukunaga y col., 2005). Estas moléculas son una familia de mediadores lipídicos que han sido caracterizados como lipoxina A4 (LX4) y 15-epi-lipoxina A4. Ambas al acoplarse a los receptores ALX permitirían la resolución de inflamación (Serhan y col., 2008; Ramstedt y col., 1987). Sin embargo, las lipoxinas parecen tener un potencial terapéutico en distintos modelos patológicos, aunque no son claramente entendidos. Entre los roles que se le reconocen a las lipoxinas se encuentran algunas funciones de interés como: 1) Estimulación de la expresión de genes relacionados con rutas anti-inflamatorias (Qiu y col., 2001).

2) Regulación de la activación del factor de transcripción NF- κ B.

3) Estimulación de los macrófagos para que fagociten a los PMN.

4) Regulación de la organización del citoesqueleto en macrófagos.

5) Reprogramación de la producción de citoquinas en los macrófagos induciendo un cambio fenotípico en estas células que dejarían de ser pro-inflamatorias (Prieto Chinchilla P., 2010).

Por lo antes expuesto, es ésta un área particularmente interesante de la investigación que intenta establecer la relación entre la infección por *H. pylori* y las enfermedades extragástricas. Es así que el impacto de la infección con *H. pylori* en el sistema respiratorio representa un campo con datos no concluyentes, que suscitan muchas preguntas pendientes de respuesta y de gran interés para la práctica clínica de la medicina, considerando la importancia y prevalencia de las enfermedades del sistema respiratorio.

Hasta el momento, no se ha investigado el rol de este microorganismo en la enfermedad pulmonar, aún cuando se sabe que este órgano puede ser blanco de la infección, por lo que

en el marco de este trabajo de tesis se propuso evaluar el pulmón como un posible órgano blanco después de la infección.

Los estudios contribuirán a entender los mecanismos que median la infección por *H. pylori* en mucosas extragástricas.

Objetivos

Objetivos generales y específicos

OBJETIVO GENERAL

Estudiar en un modelo experimental en ratón si la infección oral con *H. pylori* induce una respuesta inflamatoria en pulmón. Se analizarán aspectos culturales y capacidad de desarrollo de estrés oxidativo y nitrosativo en el sistema respiratorio durante la infección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Investigar la respuesta inflamatoria en pulmón luego de la infección orotraqueal con *H. pylori*, analizando los perfiles de expresión de citoquinas y quimiocinas. Analizar el posible rol protector de IL-17 en pulmón. Para el cumplimiento del objetivo se realizarán las siguientes actividades:

- ✓ Evaluar el índice de inflamación y marcadores de edema pulmonar.
- ✓ Investigar la expresión de IL-17, iNOS, TNF- α , IL-10, IL-4, IL-1 β , IL-8, I-CAM, V-CAM, CCT, MMP-9.
- ✓ Evaluar la invasividad de *H. pylori* en ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), estómago y pulmón de ratones infectados por vía oral.

2) Analizar las poblaciones celulares en los lavados broncoalveolares (LBA) y los cambios morfológicos en el estroma de pulmón como resultado de la infección oral. Para el cumplimiento de este objetivo:

- ✓ Estudiar cambios en la viabilidad de células de LBA.
- ✓ Cuantificar población de macrófagos, linfocitos y PMN en LBA.
- ✓ Investigar concentraciones de proteínas en LBA.
- ✓ Analizar niveles de Lactato deshidrogenasa (LDH) en LBA.
- ✓ Citotoxicidad
- ✓ Investigar cambios histopatológicos en pulmón.
- ✓ Determinar peroxidación lipídica a través de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbiturico (TBAR's) en pulmón.
- ✓ Determinar la actividad de la enzima Catalasa en pulmón.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

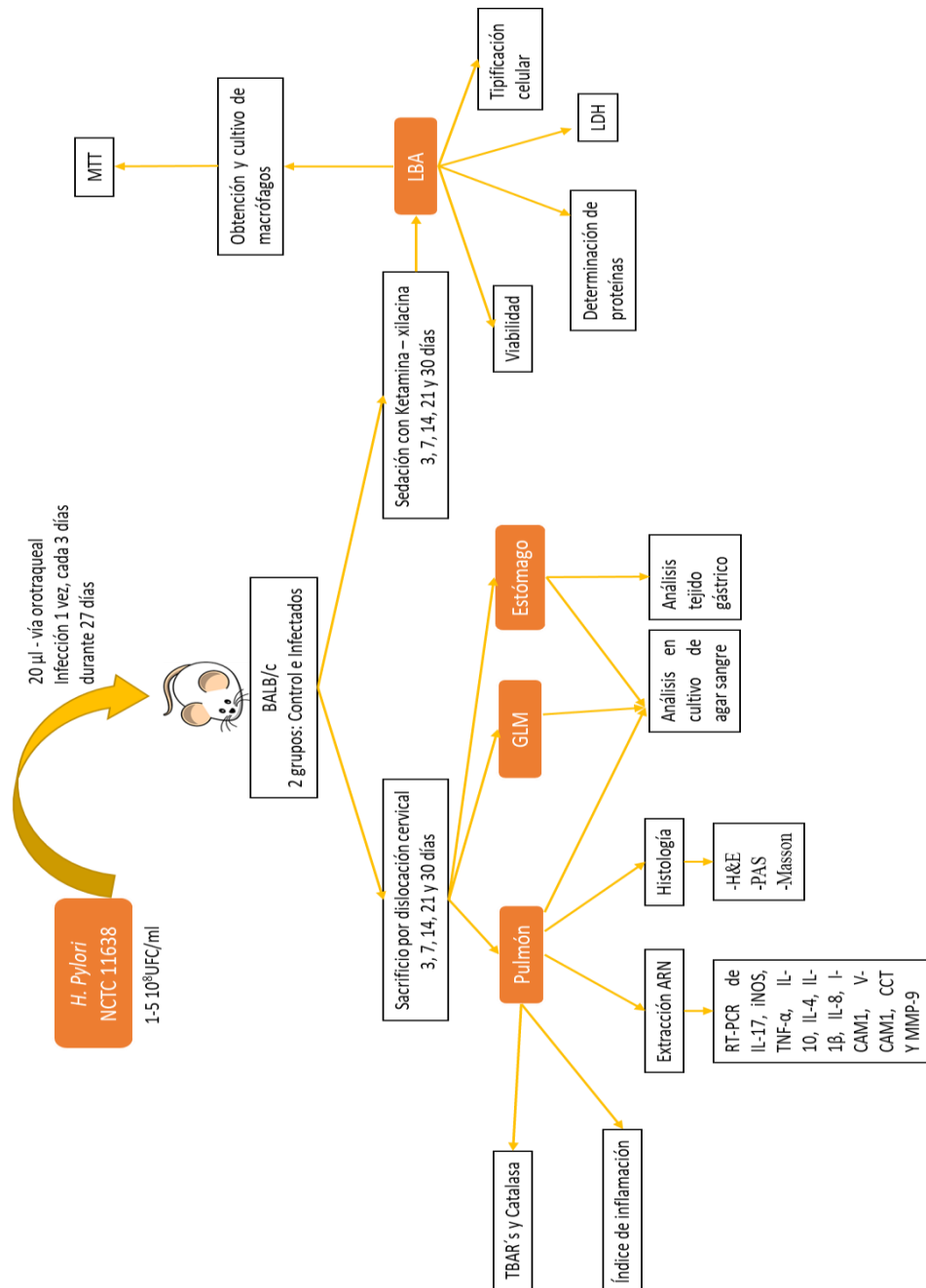


Figura 22: Protocolos de trabajo. En el esquema se muestran brevemente los estudios llevados a cabo. TBAR's: Ácido tiobarbitúrico; H&E: Hematoxilina&Eosina; PAS: Ácido periódico de Schiff; RT-PCR: cadena en reacción de la polimerasa con transcriptasa inversa; LDH: Lactato deshidrogenasa; MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol.

Animales y protocolo de experimentación

Se utilizaron cepas de ratones BALB/c que fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos, producidos y conservados en el bioterio de Universidad Nacional de San Luis-IMIBIO-SL según protocolo realizado para experiencia con animales aprobado por Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA). En los experimentos se usaron ratones machos entre 25-30 gramos. En cada experimento se utilizó un total de 20 animales (n=20).

Cepa e infección

Se usó la cepa de referencia NCTC 11638 de *H. pylori* cedida gentilmente por la Dra. Teresa Alarcón Cavero, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid-España. La cepa es CagA (-) y VacA (+). Las bacterias fueron cultivadas en Agar Mueller-Hilton (Britania, Buenos Aires, Argentina) suplementado con 5% de sangre equina a 37°C en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂), a partir de la cual se preparó una suspensión de 1-5x10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) de *H. pylori* para la infección. Los ratones fueron divididos en dos grupos, infectados (I) y control (C). Al grupo de los infectados, se le administró 20 µl de la suspensión del microorganismo por instilación orotraqueal; mientras que al grupo control se le administró, por la misma vía, buffer fosfosalino pH 7,4 (PBS 1X) estéril. Cada ratón recibió una vez la suspensión cada 3 días en un periodo total de un mes.

Medición del índice de inflamación

Los pulmones de ambos grupos fueron obtenidos de forma aséptica y separados quirúrgicamente del resto de la vía respiratoria. Cada pulmón se llevó hasta peso contante, colocando las muestras a 60 ° C durante 48 horas. A partir de la diferencia de peso se obtiene un índice que se puede asociar a los niveles de retención de agua de los tejidos, como una medida del grado de inflamación.

Extracción de ARN y determinación de expresión IL-17, iNOS, TNF- α , IL-10, IL-4, IL-1 β , IL-8, I-CAM1, V-CAM1, CCT y MMP-9

El ARN del tejido pulmonar se extrajo usando TRIzol (Life Technologies) se efectuó siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- 1) Se agregó 500 µl de TRIzol a un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se colocó la muestra de pulmón, realizando la homogenización del mismo.
- 2) Se centrifugó a 11000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos.
- 3) Se recuperó el sobrenadante (SN) y se incubó 5 minutos a 15-30°C.
- 4) Se agregó 200 µl de cloroformo, luego se agitó 15 segundos. Se llevó a incubar 2-3 minutos a 15-30°C.
- 5) Se centrifugó a 11000 rpm durante 15 minutos.
- 6) Se separó la fase acuosa, y se la traspasó a un nuevo tubo Eppendorf.
- 7) Se adicionó 400 µl de isopropanol para precipitar el ARN.
- 8) Se incubó 10 minutos a 15-30°C.
- 9) Se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos.
- 10) Se removió el SN y se lavó el pellet con 800 µl de etanol 75%.
- 11) Se centrifugó a 11000 rpm durante 5 minutos.
- 12) Se dejó secar el pellet, para luego agregar 50 µl de H₂O ultrapura, y se incubó 10 minutos a 55-60°C.

La cuantificación del mismo se llevó a cabo mediante la preparación de una dilución 1/100 de las muestras, las cuales posteriormente fueron medidas por espectrofotometría usando NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Las muestras de ARN fueron adaptadas para dar una concentración final de 2 ng/µl. Para la síntesis de ADN copia (ADNc), se utilizó 2 µg total de ARN.

La retrotranscripción se realizó utilizando la retrotranscriptasa Moloney Murine Leukemia virus reverse Transcriptase (Invitrogen) y random primers, mediante el siguiente protocolo:

- 1) En un tubo Eppendorf de 0,2 ml se adicionó H₂O estéril, primer y templado de ARN.
- 2) Se incubó la mezcla a 70°C durante 5 minutos. Posteriormente se la colocó en hielo.
- 3) Se adicionó:

- Buffer de reacción 5X
- Mix de dNTPs 10 Mm
- Inhibidor de ribonucleasa 20V
- H₂O deionizada

4) Se incubó a 25°C durante 5 minutos.

5) Se adicionó 200 unidades de retrotranscriptasa. Luego se incubó durante 10 minutos a 25°C.

6) Posteriormente se incubó a 42°C durante 1 hora.

7) Se colocó 10 minutos a 70°C para frenar la reacción. Posteriormente se colocó en hielo.

A partir del ADNc, se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los genes que codifican para interleuquinas y quimocinas empleando primers específicos (tabla 1). Los fragmentos obtenidos fueron identificados en geles de agarosa coloreados con Gel Red (GenBiotech).

El tamaño del fragmento de ADN se determinó por comparación con el marcador de Peso Molecular, PCR markers de 6 bandas con un rango de PM de 50 a 1000 pb.

El análisis diferencial de la expresión de genes se realizó por semicuantificación de las bandas con un analizador de imagen (WCIF ImageJ) tomando como referencia el gen constitutivo β actina. Se estableció la relación para un gen dado respecto al gen constitutivo y la relación de la expresión de ese gen para un tiempo determinado de la infección respecto al control. Los valores menores a 1 corresponden a una disminución en la expresión y valores mayores a 1 corresponden a un aumento en la expresión. En la tabla 1 se muestran las secuencias de los primers utilizados con el programa de amplificación y los tamaños de los fragmentos esperados, mientras que en la tabla 2 se especifican los protocolos de amplificación de cada par de primers.

| PRIMERS UTILIZADOS EN RT-PCR | | |
|-------------------------------------|--|-----------------------------|
| <i>Gen</i> | <i>Secuencia de los primers (5'-3')</i> | <i>Tamaño amplicon (pb)</i> |
| β -actina | CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC GTGGGCCGCTCTAGGCAGCAA | 578 |
| iNOS | GAGAGATCCGATTTAGAGTCT GCAGATTCTGCTGGGATTTC | 630 |
| TNF- α | ATGAGCACAGAAAGCATGATC TACAGGCTTGTCACCTCGAATT | 351 |
| IL-1 β | TGCAGAGTTCCCCAACTGGTACATC GTGCTGCCTAATGTCCCCTTGAATC | 388 |
| IL-10 | GGCCCTTTGCTATGGTGTCC AAGCGGCTGGGGGATGAC | 720 |
| IL-4 | GAATGTACCAGGAGCATATC CTCAGTACTACGAGTAATCCA | 385 |
| IL-8 | TGCTTTTGGCTTTGCGTTGA GTCAGAACGTGGCGGTATCT | 201 |
| IL-17 | TCCAGAAGGCCCTCAGACTA CTCGACCCTGAAAGTGAAGG | 740 |
| Metaloproteasa (MMP)9 | GCATACTTGTACCGGTATGG TGTGAGTTTATGATGGTCCC | 225 |
| Citidiltransferasa (CCT) | AGGCTACTGTGACCGAGTA AGTCACCCTGACATAGGGCT | 350 |
| I-CAM1 | TAAGAGGACTCGGTGGATGG TTCCCCAGACTGTCACAGG | 247 |
| V-CAM1 | TGACAAGTCCCCATCGTTGA ACCTCGCGACGGCATAATT | 210 |

Tabla 1: Primers utilizados en RT-PCR. Secuencia de los primers utilizados y tamaño de los amplicones.

Protocolo de amplificación de los distintos primers

| β-actina | | |
|----------------------------------|-------------------------|---------------|
| Pasos | Temperatura (°C) | Tiempo |
| Desnaturalización inicial | 94 | 4 minutos |
| 35 ciclos | 94 | 45 segundos |
| | 60 | 1 minuto |
| | 72 | 1 minuto |
| Extensión final | 72 | 7 minutos |
| TNF-α/IL-8 | | |
| Desnaturalización inicial | 95 | 2 minutos |
| 30 ciclos | 94 | 2 minutos |
| | 55 | 1 minuto |
| | 72 | 1 minuto |
| Extensión final | 72 | 7 minutos |
| IL-1β | | |
| Desnaturalización inicial | 95 | 2 minutos |
| 30 ciclos | 94 | 1 minuto |
| | 60 | 1 minuto |
| | 72 | 1 minuto |
| Extensión final | 72 | 7 minutos |
| IL-10/IL-4 | | |
| Desnaturalización inicial | 94 | 4 minutos |
| 35 ciclos | 95 | 1 minutos |
| | 57 | 1 minuto |
| | 72 | 1 minuto |
| Extensión final | 72 | 7 minutos |
| iNOS | | |
| Desnaturalización inicial | 94 | 4 minutos |
| 35 ciclos | 94 | 45 segundos |
| | 60 | 1 minuto |

| | | |
|----------------------------------|----|-----------|
| | 72 | 1 minuto |
| Extensión final | 72 | 7 minutos |
| I-CAM1/CCT | | |
| Desnaturalización inicial | 95 | 2 minutos |
| 39 ciclos | 95 | 1 minuto |
| | 54 | 1 minuto |
| | 72 | 1 minuto |
| Extensión final | 72 | 7 minutos |
| MMP9 | | |
| Desnaturalización inicial | 94 | 2 minutos |
| 39 ciclos | 94 | 1 minuto |
| | 50 | 1 minuto |
| | 72 | 1 minuto |
| Extensión final | 72 | 7 minutos |
| V-CAM1 | | |
| Desnaturalización inicial | 95 | 2 minutos |
| 39 ciclos | 95 | 1 minuto |
| | 55 | 1 minuto |
| | 72 | 1 minuto |
| Extensión final | 72 | 7 minutos |
| IL-17 | | |
| Desnaturalización inicial | 94 | 4 minutos |
| 30 ciclos | 95 | 1 minuto |
| | 52 | 1 minuto |
| | 72 | 1 minutos |
| Extensión final | 72 | 7 minutos |

Tabla 2: Protocolos de amplificación de los distintos primers. Distintos protocolos utilizados para RT-PCR y obtención del ADNc.

Determinación de la carga bacteriana

El recuento de *H. pylori* se realizó en pulmón, GLM y estómago a los 3, 7, 14, 21 y 30 días post-infección (PI) tanto del grupo control como del infectado. Dichos órganos fueron obtenidos de forma aséptica en solución salina, para luego ser homogenizados mediante la utilización de homogenizador de tejidos de teflón Ultra Turrax IKA® T18 basic. Se sembraron 100 µl de los homogenatos y diluciones del mismo (1/10 y 1/100), en placas de agar sangre, las que fueron incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia, durante 3 a 7 días. El recuento permitió obtener unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

Identificación bioquímica y molecular de *H. pylori* en los homogenatos

La identificación bioquímica de las cepas obtenidas se llevó a cabo mediante la tinción de Gram, y reacciones positivas para ureasa, catalasa y oxidasa.

La identificación molecular se llevó a cabo mediante amplificación del ARN ribosomal (ARNr) 16S por técnica de PCR. Para ello, el ADN del microorganismo fue obtenido a partir de los homogenatos mediante la utilización de Tritón. Los pasos realizados fueron los siguientes:

- 1) En un tubo Eppendorf que contenía una porción del homogenato se adicionó 150 µl de Tritón 1X (diluido en buffer TE)
- 2) Se incubó durante 15 minutos a baño maría 100°C.
- 3) Luego se centrifugó durante 5 a 10 minutos a una velocidad entre 10000-12000 rpm.
- 4) Finalmente se tomaron aproximadamente 80 µl del sobrenadante, teniendo cuidado de no tocar el precipitado, y se llevaron a un nuevo tubo que se conservó a -4°C.

Posteriormente, mediante PCR con el par de primers del gen *16S*, se amplificó, obteniendo un amplicon de 390 pb.

La secuencia de los primers es:

- ✓ Forward: 5'-GGAGGATGAGGTTTTAGGATTG-3'
- ✓ Reverse: 5'-CGTTTAGGGCGTGGACT-3'

La amplificación de ADN se realizó en un volumen final de mezcla de reacción de 20 µl, conteniendo 1 µl de cada oligonucleótido; 0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Promega, Wisconsin, Madison, USA), 1x de buffer de reacción (concentración madre 10x: 50 mM KCl,

10 mM Tris-HCl, 0,1% Tritón X-100 (Promega), 1 U de Taq ADN polimerasa en buffer B (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1mM DTT, 50% Glicerol, 0,5% Nonidet-P40, 0,5% Tween 20 (Promega). Se usó como templado 1 ml de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador programable BIORAD T100™ Thermo cycler (Hercules, California, Estados Unidos) mediante el siguiente protocolo:

| <i>Pasos</i> | <i>Temperatura (°C)</i> | <i>Tiempo (minutos)</i> |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Desnaturalización inicial | 94 | 3 |
| 35 ciclos | 94 | 1 |
| | 58 | 1 |
| | 72 | 1 |
| Extensión final | 72 | 10 |

Análisis de tejido gástrico

El estómago obtenido asépticamente de los ratones controles e infectados se lavó con solución fisiológica, se abrió por la curvatura mayor y se extendió sobre un portaobjeto para identificar con microscopia óptica la presencia o ausencia de úlceras. Las lesiones fueron contadas y se midió su longitud. Para el caso de petequias, estas fueron contadas, y cada grupo de 5 petequias se las tomaba como 1 mm de úlcera de acuerdo al protocolo descrito por Awaad y col. (2017).

Recolección de Lavados Broncoalveolares (LBA)

Transcurridos los días 3, 7, 14, 21 y 30 PI, a ratones de ambos grupos se los anestesió con ketamina-xilacina, se les practicó una incisión en la tráquea y colocó una cánula para realizar LBA con PBS 1X estéril, el cual fue recolectado y centrifugado a 3000 rpm para realizar los debidos análisis. El sobrenadante se tomó y se utilizó para la determinación de LDH, mientras que el precipitado contenía las células que se utilizaron para tipificación de población celular, evaluación de la viabilidad y cultivo celular.

Evaluación de la viabilidad de células del LBA

Las células obtenidas fueron teñidas con azul de Tripán y contabilizadas en cámara de Neubauer. El colorante no puede penetrar y teñir a células vivas con membranas íntegras, por lo que permite diferenciar las células muertas (con disrupción de la membrana) de las vivas. A las células recolectadas mediante LBA se las centrifugó para concentrar, se las extendió en medio DMEM y luego se le agregó 1 µl de la muestra a 99 µl de azul de Tripán. 20 µl se agregó a la cámara de Neubauer para contabilizar las células vivas por cuadrante.

Tipificación de poblaciones celulares

Para evaluar las poblaciones celulares, el primer LBA (aproximadamente 1 ml) fue centrifugado y el sedimento se fijó con metanol y se tiñó con Giemsa. Los recuentos y tipificación de las poblaciones celulares se realizaron a partir de los extendidos, donde sobre un total de 100 células se identificó cada tipo, por la morfología característica.

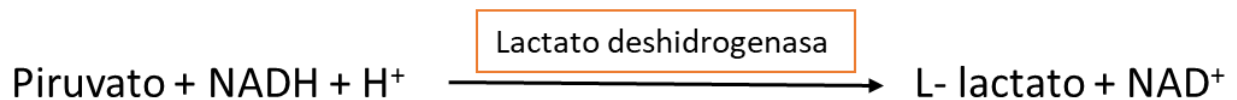
Determinación de proteínas en pulmón

La determinación de proteínas presentes en el tejido pulmonar se llevó a cabo mediante el método de Lowry, a partir de una dilución 1/20 de las muestras. A 200 µl de la muestra se le agregó 800 µl de solución C (1ml de tartrato de sodio al 2%, 1 ml de CuSO₄ al 1% y 98 ml de NaCO₃ al 2%), se agitó e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se le agregó Reactivo de Folin-Ciocalteu en una dilución 1:1, se agitó nuevamente e incubó 10 minutos.

Luego se leyó a 750 nm en espectrofotómetro.

Determinación de Lactado deshidrogenasa (LDH)

La determinación de LDH se realizó mediante kit comercial (Wiener lab). Se basa en la reacción:



Posee 2 reactivos, A y B. 3 ml del reactivo B se agregó al reactivo A, y se mezcló. El reactivo A se preincubó, luego se agregó 100 µl de la muestra. La absorbancia se leyó a 340 nm, inmediatamente de agregado el reactivo y a los 60, 120 y 180 segundos. Se determinó la

diferencia promedio de las absorbancias por minuto (A/min), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores.

Los cálculos utilizados fueron:

$$20\text{ H (U/I)} = a/\text{min} \times 4,921$$

dónde: 4,921 es un factor de conversión a 25°C y 340 nm.

Los valores de referencia están entre 100-240 (U/I).

Extracción y cultivo de macrófagos del LBA

A partir del LBA obtenido, se centrifugó a 3000 rpm. Las células fueron resuspendidas en DMEM y se cultivaron en placas de 96 wells.

Determinación de superóxido por Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Para la determinación se preparó una solución stock de MTT de 5mg/ml en PBS 1X. Posteriormente dicha solución se agregó a las placas con los macrófagos cultivados, y luego se le adicionó 100 µl HCL 0,04N en 150 µl de isopropanol para ver la formación de cristales azules. Luego se llevó leyó a 570-550 nm.

Análisis histopatológico de pulmón

Del pulmón derecho extraído en forma aséptica, se tomó el lóbulo inferior, se fijó con líquido de Bouin y se montaron las muestras en tacos de parafina.

Las muestras fueron deshidratadas pasándolas en una serie de etanol creciente y embebidos en parafina. Se realizaron cortes en micrótomos de 5-6 µm de espesor. Las secciones fueron teñidas con las técnicas de Hematoxilina-Eosina (H&E), Tricrómico de Masson y Ácido peryódico de Schiff (PAS). Fueron visualizadas en microscopio óptico Olympus BX50 conectado a una cámara digital con los objetivos de 10, 40 y 100X. El análisis de las fotografías se realizó con el sistema ImageJ. Evidencia histológica de daño pulmonar fue clasificado en una escala que iba desde el 0 (normal) al 10 (más severo), esencialmente usando como base: el grado de congestión vascular, edema hemorrágico, adelgazamiento del septum alveolar (edema), formación de membrana hialina en las vías respiratorias distales y

acumulación de neutrófilos. Un score total de menos de 4 fue considerado como daño medio, un score entre 4-8 fue calificado como moderado, y un score mayor a 9, como severo.

Tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E)

Se desarrolló mediante el siguiente protocolo:

- 1) Para desparafinar, se colocó la muestra en una solución de xilol durante 20 minutos. Posteriormente, se la puso en una nueva solución de xilol por otros 20 minutos.
- 2) Para hidratar, se la trasladó por una batería de alcoholes de 100° a 70°, durante 10 segundos en cada una.
- 3) Se lavó con H₂O común.
- 4) Se la puso en contacto con el colorante Hematoxilina durante 5 minutos.
- 5) Se lavó con H₂O común, para luego hacerlo con H₂O alcalina, y posteriormente H₂O común de nuevo.
- 6) Se la puso en contacto con el colorante Eosina durante 5-6 minutos.
- 7) Para su deshidratación, se la trasladó por una batería de alcoholes crecientes de 70° a 100°.
- 8) Se sumergió por soluciones de xilol, 2 veces, para luego montar y visualizar al microscopio.

Tinción de Tricromico de Masson

- 1) Para desparafinar, se colocó la muestra en una solución de xilol durante 20 minutos. Posteriormente, se la puso en una nueva solución de xilol por otros 20 minutos.
- 2) Para hidratar, se sumergió por una batería de alcoholes que iban de 100° a 70°, durante 10 segundos en cada una.
- 3) Se fijó en liquido de Bouin durante 1 hora a 56°C.
- 4) Se enfrió lentamente en agua. Posteriormente se lavó en H₂O común hasta la desaparición del color amarillo. Luego se lavó con H₂O deionizada (H₂O_d).
- 5) Se colocó durante 5 minutos en Hematoxilina de Weigert.
- 6) Se viró con H₂O común tibia. Luego se diferenció con alcohol clorhídrico.
- 7) Se viró con H₂O común tibia, y luego con H₂O_d.

- 8) Se colocó la solución de Escarlata de Beibrich-Fucsina ácida durante 1 minuto. Luego se lavó con H_2O_d .
- 9) Se colocó durante 10-15 minutos en solución de ácido fosfomolibdelico-fosfotungstico, luego se lavó con H_2O común y H_2O_d .
- 10) Se la colocó en solución de azul de anilina durante 10 minutos.
- 11) Posteriormente, se la llevó a solución acuosa de ácido acético 1% durante 5 minutos. Luego se lavó en H_2O común.
- 12) Se deshidrató la muestra sumergiéndola en soluciones de alcohol creciente (70° a 100°), luego en xilol y por último se montó para ser visualizado al microscopio.

Tinción de Ácido peryódico de Schiff (PAS)

- 1) Para desparafinar, se colocó la muestra en una solución de xilol durante 20 minutos. Posteriormente, se la puso en una segunda solución de xilol por otros 20 minutos.
- 2) Para hidratar, se la trasladó por una batería de alcoholes decrecientes de 100° a 70° , durante 10 segundos cada una.
- 3) Se lavó con H_2O común.
- 4) Se colocó en ácido peryódico durante 10 minutos. Luego se lavó con H_2O_d .
- 5) Se agregó el reactivo de Schiff durante 1 minuto. Luego se lavó con H_2O común tibia a caliente durante 5-10 minutos.
- 6) Se colocó Hematoxilina durante 1 minuto. Luego se lavó con H_2O común.
- 7) Por último se deshidrató trasladando la muestra en alcoholes de concentración creciente (70° a 100°), se incubó en xilol y se montó para su observación al microscopio.

Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR's)

A partir de homogenatos de pulmón se realizó el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA) y los niveles de los productos de peroxidación lipídica, fueron determinados espectrofotométricamente como TBAR's. La densidad óptica (DO), es medida a 535 nm y 572 nm para corregir la absorción basal. Los productos se calcularon usando la diferencia en DO en las dos longitudes de onda y la cuantificación se hizo utilizando una curva de calibración.

Medición de actividad de catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa (CAT) fue medida en los homogenatos de pulmón. La mezcla de reactivos utilizados contenía 50 mM de buffer K-fosfato (pH 6,5) y 3 mM de H₂O₂ diluido con 50 mM de buffer fosfato (pH 7).

La reacción se inició con la adición de la muestra y la absorbancia fue medida a 240 nm a temperatura ambiente. La disminución en la absorbancia fue registrada y se calculó la actividad usando un coeficiente de extinción molar de 40 M⁻¹ cm⁻¹.

Análisis estadísticos

Cada experiencia se realizó un mínimo de 3 veces. De cada experiencia, se compararon los valores obtenidos entre los grupos de animales infectados y los no infectados (control) mediante la utilización de la varianza ANOVA y posteriores comparaciones por Tukey. Todos los datos son expresados como media ± D.E (desviación estandar). Valores p<0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

✓ Evaluación de la invasividad de *H. pylori* en ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), estómago y pulmón de ratones infectados por vía orotraqueal

La recuperación de *H. pylori* del tejido pulmonar, como de los GLM y del estómago fue determinado por recuento de células viables. El microorganismo fue identificado por microscopía y reacción positiva para ureasa, catalasa y oxidasa.

A partir de los pulmones obtenidos de los ratones infectados, *H. pylori* pudo ser aislado a los 3 y 7 días PI. Se pudo identificar el microorganismo en agar sangre, observándose las colonias características pequeñas y transparentes descritas para el microorganismo. La tinción de Gram mostró bacilos gram-negativos con morfología helicoidal y la identificación fenotípica dio resultados positivos para las 3 pruebas bioquímicas. El recuento de viables fue de $1,3 \times 10^4 \pm 1,5$ UFC/ml a partir de muestras correspondientes a los 3 días PI, mientras que se obtuvo un recuento de $2,3 \times 10^3 \pm 1,8$ UFC/ml a los 7 días PI. No hubo recuperación del microorganismo a partir del pulmón proveniente de ratones infectados en los tiempos posteriores de infección (Fig. 23 A, B y C). La detección molecular de ADN de *H. pylori* se realizó mediante el ensayo de PCR, utilizando el primers 16S ARNr. Los resultados obtenidos a los 3 y 7 días PI, muestran una marcada intensidad de las bandas amplificadas, mientras que hubo una disminución de la intensidad de las mismas a los 14 y 21 días PI sin amplificación de ADN a los 30 (Fig. 23D).

Respecto a las muestras de los GLM y del estómago de los ratones infectados vía orotraqueal, no hubo recuperación del microorganismo en ningún tiempo. Sin embargo, las muestras del tejido gástrico mostraron lesiones a nivel de la mucosa a los 3 y 7 días PI, con un promedio de 3 úlceras en el grupo control en comparación con el grupo de ratones infectados, que fueron de 7 úlceras promedio contadas en 100 campos microscópicos.

Recuperación de *H. pylori* a partir de pulmón

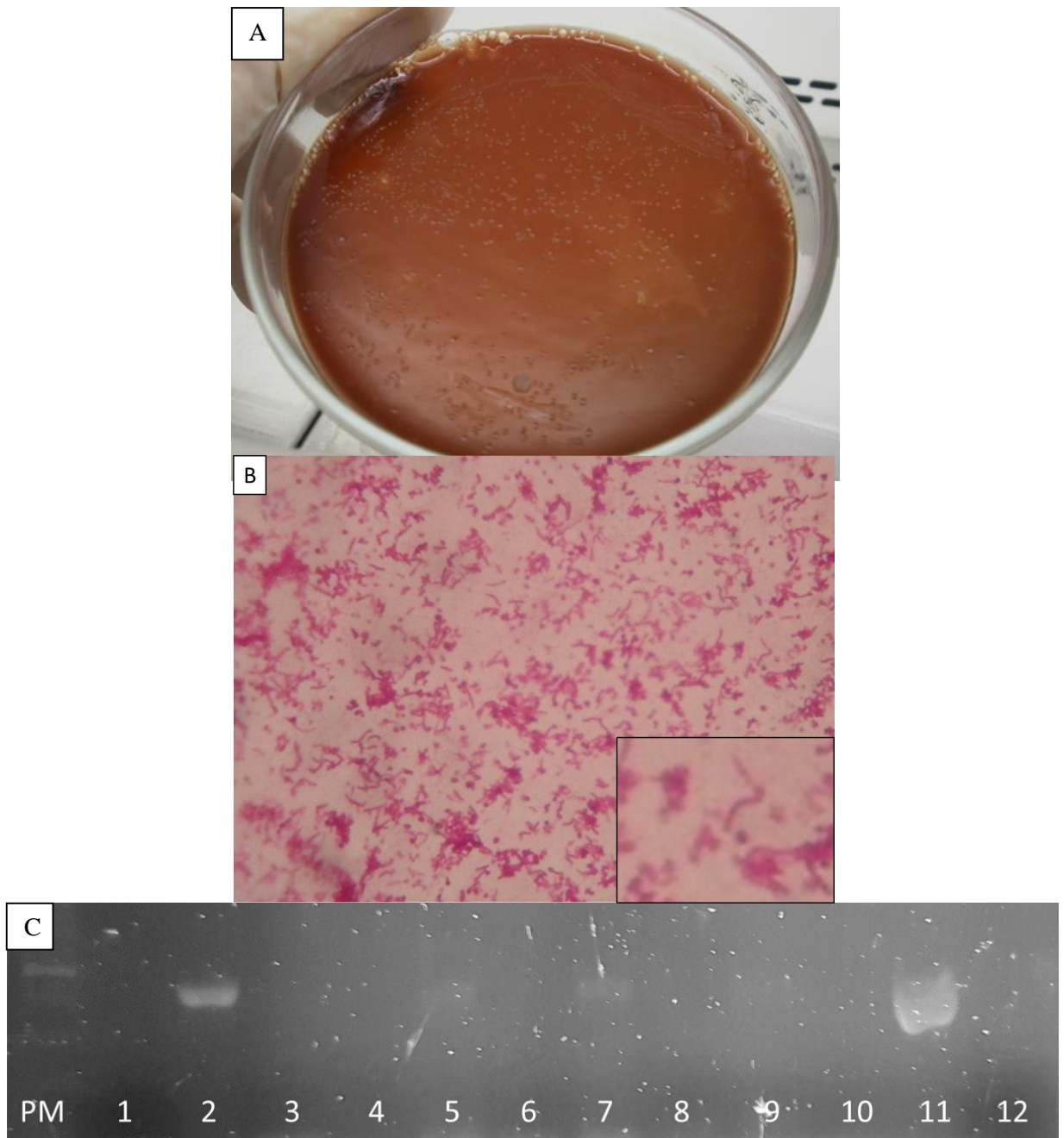


Figura 23: Recuperación de *H. pylori* a partir de pulmón **A)** Fotografía del cultivo en agar sangre obtenido a partir de pulmón, donde se observan colonias pequeñas y transparentes. **B)** Tinción de Gram de las colonias obtenidas, se observan microorganismos gram-negativos con forma espiralada (Inset). **C)** Gel de agarosa donde se observan los productos de PCR obtenidos. PM: Peso molecular; 1: C 3 días PI; 2: I 3 días PI; 3: C 7 días PI; 4: I 7 días PI; 5: I 7 días PI; 6: C 14 días PI; 7: I 14 días PI; 8: C 21 días PI; 9: I 21 días PI; 10: I 30 días PI; 11: Control positivo; 12: Control negativo (C = Control; PI = Post-infección).

✓ Evaluación del índice de inflamación o marcador de edema pulmonar

El índice de inflamación o marcador de edema pulmonar se evaluó determinando la cantidad de agua retenida producto del cambio de permeabilidad hística, en los distintos tiempos de infección. En los primeros tiempos de infección no se observó diferencia significativa en la cantidad de agua retenida en el tejido pulmonar. Sin embargo, se observó un aumento a partir del día 21, el cual se hace significativo en el día 30 para el grupo infectado respecto al grupo control; lo que estaría indicando un aumento de la permeabilidad capilar como consecuencia del edema pulmonar (Fig. 24).

Índice de inflamación

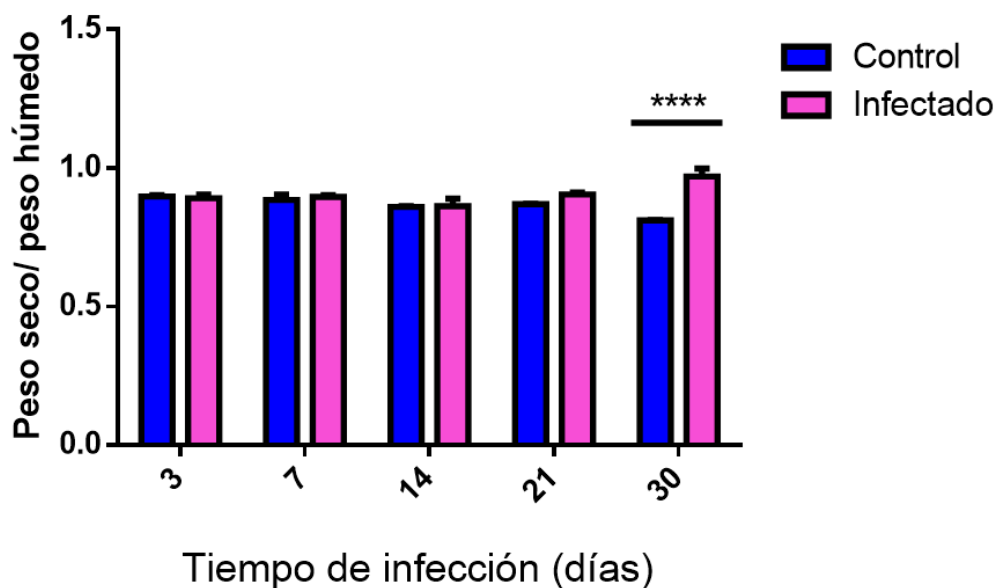


Figura 24: Índice de inflamación pulmonar. El grado de permeabilidad hístico no se modificó en los pulmones del grupo infectado respecto al control, en los primeros días de infección (3, 7 y 14). Sin embargo, se visualizó un leve aumento en los infectados a partir de los 21 días, mostrando un aumento significativo a los 30 días PI (****: $p < 0,0001$).

✓ Marcadores de disfunción endotelial

La expresión del ARN mensajero (ARNm) de los marcadores de disfunción endotelial, I-CAM1 y V-CAM1, muestran un marcado aumento de la permeabilidad a los 7 días, disminuye levemente a los 14 días, manteniéndose en ese nivel hasta los 21 días PI (Fig. 25). Este resultado estaría indicando que entre los 7 a 21 días se produciría el mayor influjo de células sanguíneas como PMN, linfocitos, entre otros.

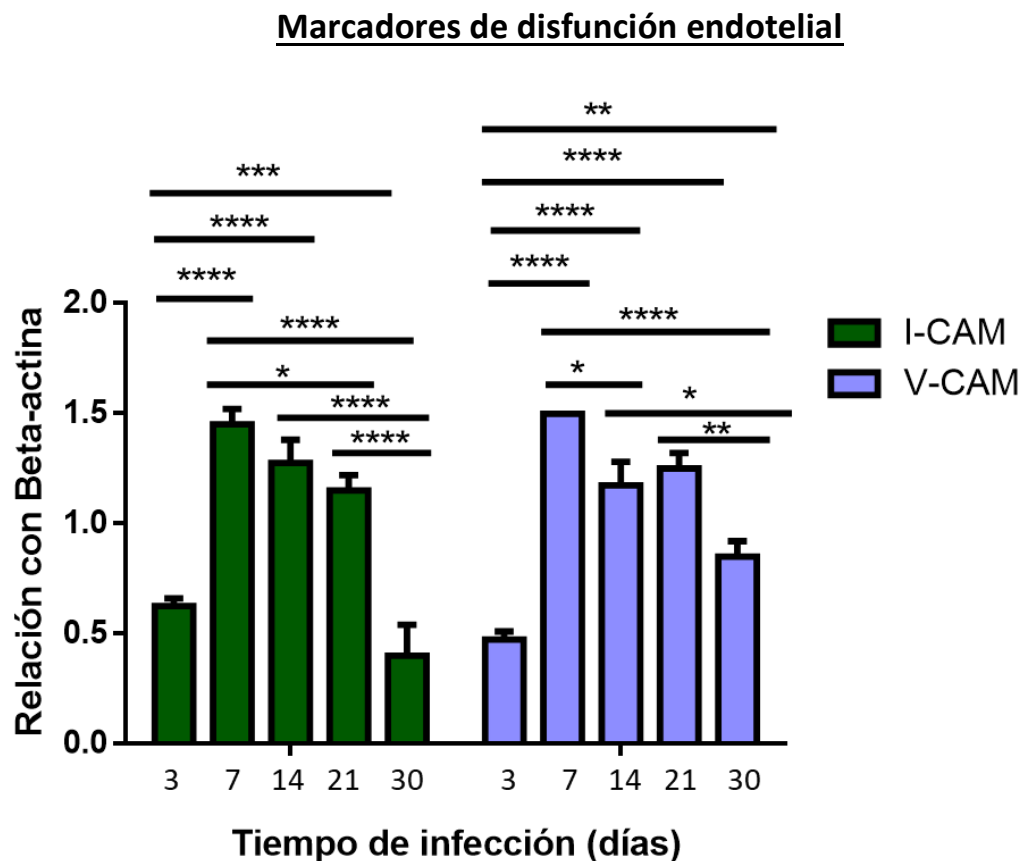


Figura 25: Marcadores de disfunción endotelial. Ambos marcadores se comportan de forma similar en cuanto a la expresión. Se visualiza un aumento hasta tener un pico a los 7 días PI, luego del cual disminuye lentamente, pero I-CAM a los 30 días tiene una disminución abrupta, mientras que la disminución de V-CAM no es tan notoria (****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

✓ Investigación de las concentraciones de proteínas en LBA

Las proteínas son un indicador de cambios en la permeabilidad celular que brindan información acerca de un potencial daño tisular generado por la infección.

Las concentraciones de proteínas en mg/ml fueron determinadas en LBA obtenido de los animales controles e infectados. Al día 3 se incrementó levemente y alcanzó valores más significativos a los 7 días después de la infección. Si bien hubo una disminución de la concentración en el grupo de ratones infectados al día 14, se mantuvieron los valores proteicos, más o menos constante hasta los 30 días PI (Fig. 26).

Concentración de proteínas presentes en LBA

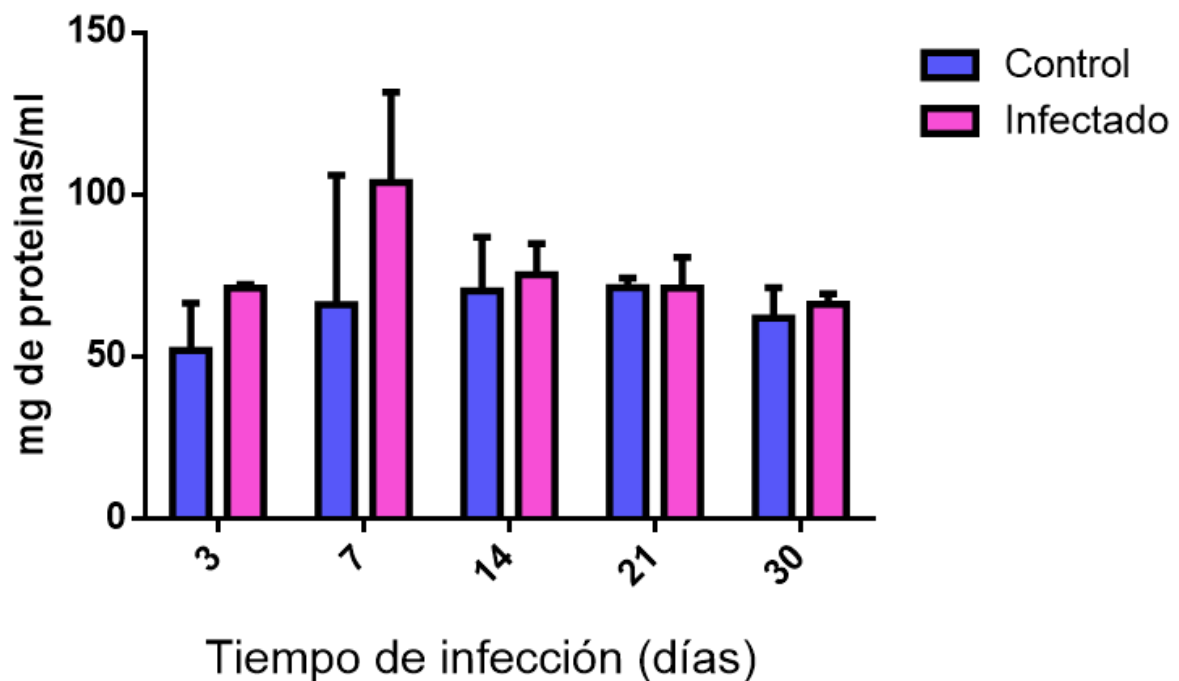


Figura 26: Concentración de proteínas presentes en LBA. En el gráfico se muestran las concentraciones de proteínas obtenidas a los distintos tiempos de infección (3, 7, 14, 21, 30 días), tanto de ratones infectados como de los controles. Se puede visualizar un aumento de la concentración en los primeros días de infección en los animales infectados.

✓ Niveles de Lactato deshidrogenasa (LDH) en LBA

En procesos infecciosos otro indicador de daño celular es la liberación de enzima Lactato deshidrogenasa (LDH). Los niveles de LDH se determinaron a partir del LBA obtenido de ratones de ambos grupos, utilizando un kit comercial (Wiener lab). Durante el tiempo de estudio, los ratones del grupo control mostraron valores normales de la enzima, mientras que, en los animales infectados se observó un aumento gradual de los valores a medida que avanzaba el tiempo de infección con valores próximos a las 400 U/I a los 21 días PI (Fig. 27). Estos resultados muestran que el daño celular producido es mayor a medida que aumenta el tiempo de la infección.

Valores de Lactato deshidrogenasa (LDH)

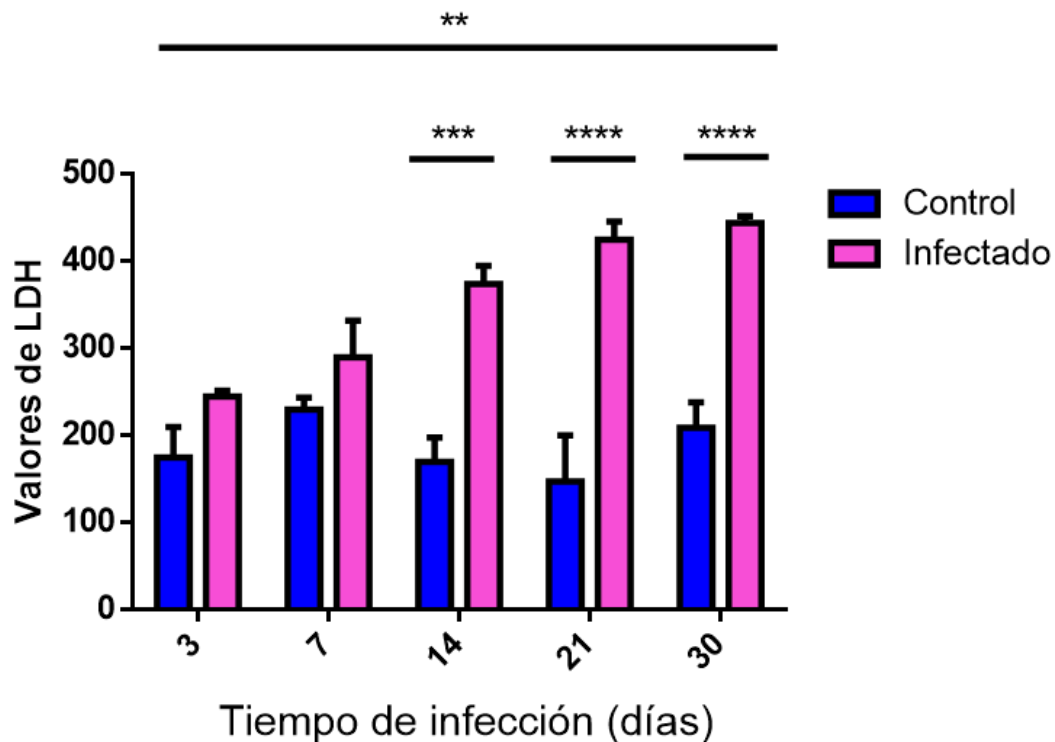


Figura 27: Valores de Lactato deshidrogenasa (LDH). En el gráfico se observa un aumento gradual de los valores de LDH en los animales infectados a medida que transcurre el tiempo de infección, mientras que los valores de LDH para los animales controles permanecen dentro del rango normal (100-240 U/I) (****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$).

✓ Estudio de cambios en la viabilidad de células de LBA

La determinación de la viabilidad de las células libres presentes en el LBA y el cambio de las mismas durante el tiempo de infección, establecería una correlación directa con el daño que la infección por *H. pylori* podría causar. Para ello, a partir de los LBA se obtuvo las células por centrifugación, se tiñeron con azul de Tripan y se realizó el recuento. La viabilidad celular no mostró diferencia significativa en los valores obtenidos para los días 3, 7 y 14 días luego de la infección. Sin embargo, a los 21 y 30 días posterior a la infección, el porcentaje de células viables del LBA obtenido a partir de los animales infectados disminuyó en comparación con el control (Fig. 28).

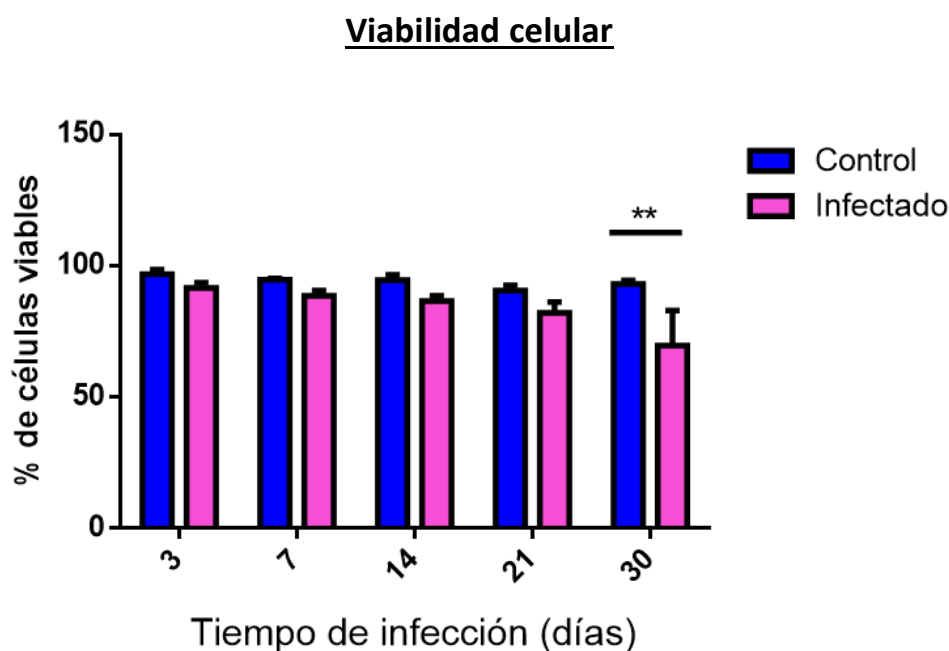


Figura 28: Viabilidad celular. Los resultados fueron expresados en porcentaje de células viables obtenidas del LBA. Los primeros tiempos de infección (3, 7 y 14 días) no mostraron diferencia significativa para la viabilidad de células de LBA de ratones infectados con respecto a los controles. A los 21 y 30 días PI, la viabilidad de las células obtenidas a partir del grupo de ratones infectados disminuyó cuando se comparó con el grupo control (**: $p < 0,01$).

✓ Cuantificación de macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares en LBA

En un sistema respiratorio sano, la principal población celular que se encuentra presente en los LBA está constituida principalmente por macrófagos, que es la primera línea de defensa. Pero en los procesos infecciosos, se produce la liberación de citoquinas y otras sustancias que atraen a distintos tipos celulares en el tejido pulmonar, para poder resolver la infección. El análisis de los diferentes tipos celulares en los LBA posterior a la infección, se realizó con muestras provenientes tanto de ratones del grupo control, como del grupo infectados. El recuento de la población celular de los lavados desde los ratones infectados a los 3 y 7 días PI mostró la presencia de 85% de macrófagos (M), 10% de linfocitos (L) y 5% de PMN. El grupo control exhibió una distribución normal de células inflamatorias, cuyo porcentaje fue de 95% de M y 5% de PMN (Fig. 29). Los resultados muestran, en esta infección, que hay claramente una disminución de la población de macrófagos con un incremento de linfocitos tanto a los 3 como a los 7 días PI.

Tipificación de la población celular presente en LBA

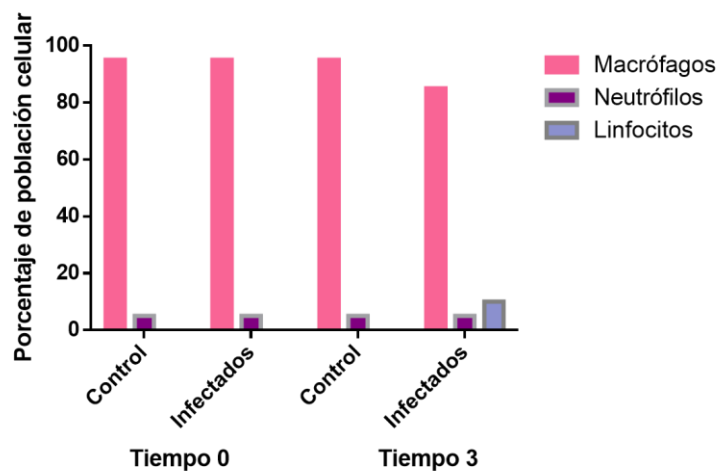


Figura 29: Tipificación de la población celular presente en LBA. El gráfico muestra los porcentajes de las poblaciones celulares presentes en el LBA en el grupo control e infectados. Los ratones controles mostraron 95% de macrófagos y 5% de neutrófilos. En infectados hubo una disminución de los macrófagos (85%) y 10% de linfocitos.

✓ Citotoxicidad

La citotoxicidad que podría generarse a partir de la infección fue medida a través del ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Para ello, macrófagos obtenidos del pulmón de los animales controles e infectados, se cultivaron en placas de 96 pocillos durante 24 horas, transcurridas las cuales se agregó la solución de MTT, se incubó durante 4 horas y se midió la absorbancia a 550-570 nm.

En los resultados obtenidos, la viabilidad de los macrófagos se presentó disminuida en el primer tiempo de infección (día 3), mientras que, en los tiempos posteriores, se observó un aumento no significativo, el cual se mantuvo constante a lo largo del resto de los días (Fig. 30).

Viabilidad celular MTT

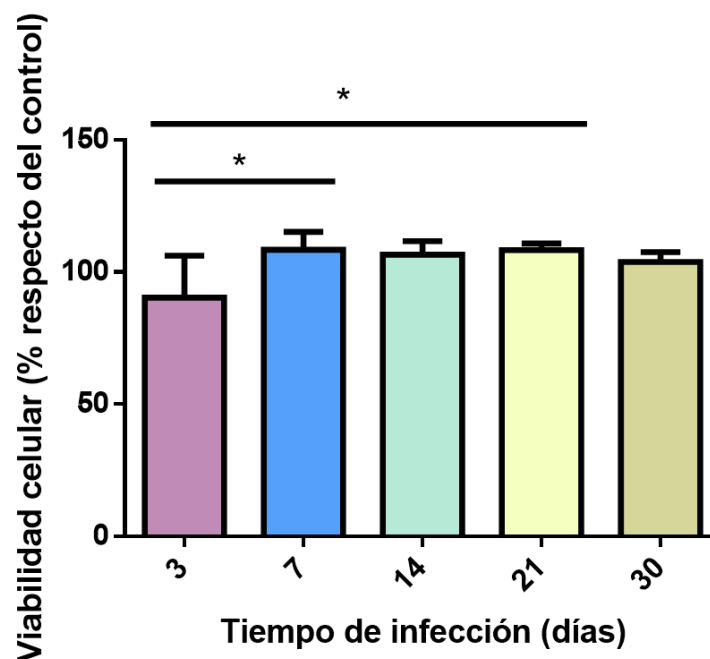


Figura 30: MTT. La gráfica muestra la relación de viabilidad celular entre los macrófagos de animales control respecto a los infectados. Se observa una disminución al tercer día de infección, mientras que en el resto de los tiempos la viabilidad no se modifica entre los controles e infectados (*: $p < 0,05$).

✓ **Expresión de IL-17, TNF- α , IL-10, IL-4, IL-1 β , IL-8.**

La cinética en la expresión del ARNm de genes que codifican para citoquinas TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-17, IL-10, IL-4 fue determinada en los distintos tiempos de infección. Durante el periodo de estudio, la cinética de todas las citoquinas mostró una gran heterogeneidad en la expresión.

Se analizó la expresión de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-17, IL-1 β e IL-8. TNF- α es una citoquina producida por monocitos, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales; la misma puede tanto estimular como inhibir su propia síntesis, dependiendo del tipo celular (Mukhopadhyay y col., 2006). Asimismo, en células epiteliales, endoteliales y fibroblastos, induce la síntesis de IL-17. En nuestro modelo animal, se observó un aumento de la expresión del ARNm de TNF- α e IL-17 en el pulmón de ratones infectados a los 7 y 14 días, que disminuye levemente al día 21 PI. En el caso de IL-17 se mantiene la expresión en el día 30 PI, mientras que TNF- α disminuye marcadamente ($p < 0,0001$) (Fig. 31A). IL-8 comienza a incrementarse a partir del día 7 y continúa aumentando a los 14 días PI, observándose un pico máximo a los 21 días (Fig. 31B).

La citoquina IL-1 β , un marcador de inflamación que activa tanto las células del sistema inmunitario innato y adaptativo por inducción de otras quimiocinas y moléculas de adhesión (Lapiente y col., 2017), mostró un aumento de la expresión a los 3 días PI, disminuyendo gradualmente hasta el día 14. En este estudio, la cinética de expresión aumenta a partir de este día alcanzando un segundo pico de expresión a los 21 días, disminuyendo levemente en el último tiempo de la infección (30 días) (Fig. 31B).

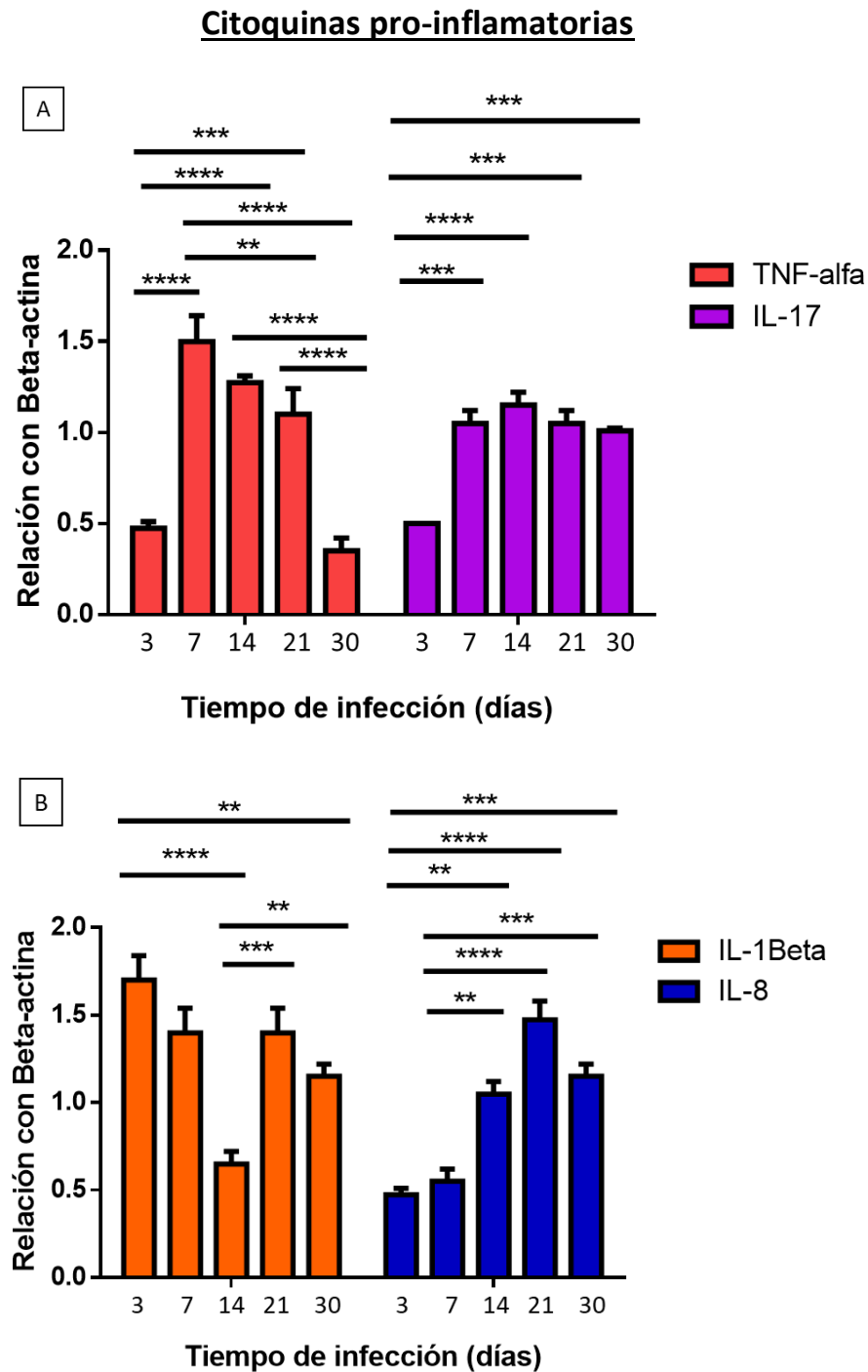


Figura 31: Expresión del ARNm de citoquinas proinflamatorias a los 3, 7, 14, 21 y 30 días post-infección. A) TNF- α muestra un aumento exponencial a los 7 días, a partir del cual disminuye gradualmente. IL-17 muestra un aumento en el día 7, y se mantiene constante a lo largo del tiempo. B) IL-1 β posee una expresión elevada a los 3 días, la cual disminuye levemente a los 14 días, luego del cual vuelve a aumentar, pero no llega a los valores iniciales. IL-8 aumenta con el tiempo, alcanzando un pico máximo a los 21 días (****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$).

El análisis de la expresión de genes que codifican para citoquinas antiinflamatorias, como las IL-4 e IL-10 mostró una cinética de expresión heterogénea con un aumento a los 7 días posterior a la infección para IL-4, mientras que IL-10 aumenta gradualmente en los primeros días de infección alcanzando su máxima expresión a los 14 días PI (Fig. 32).

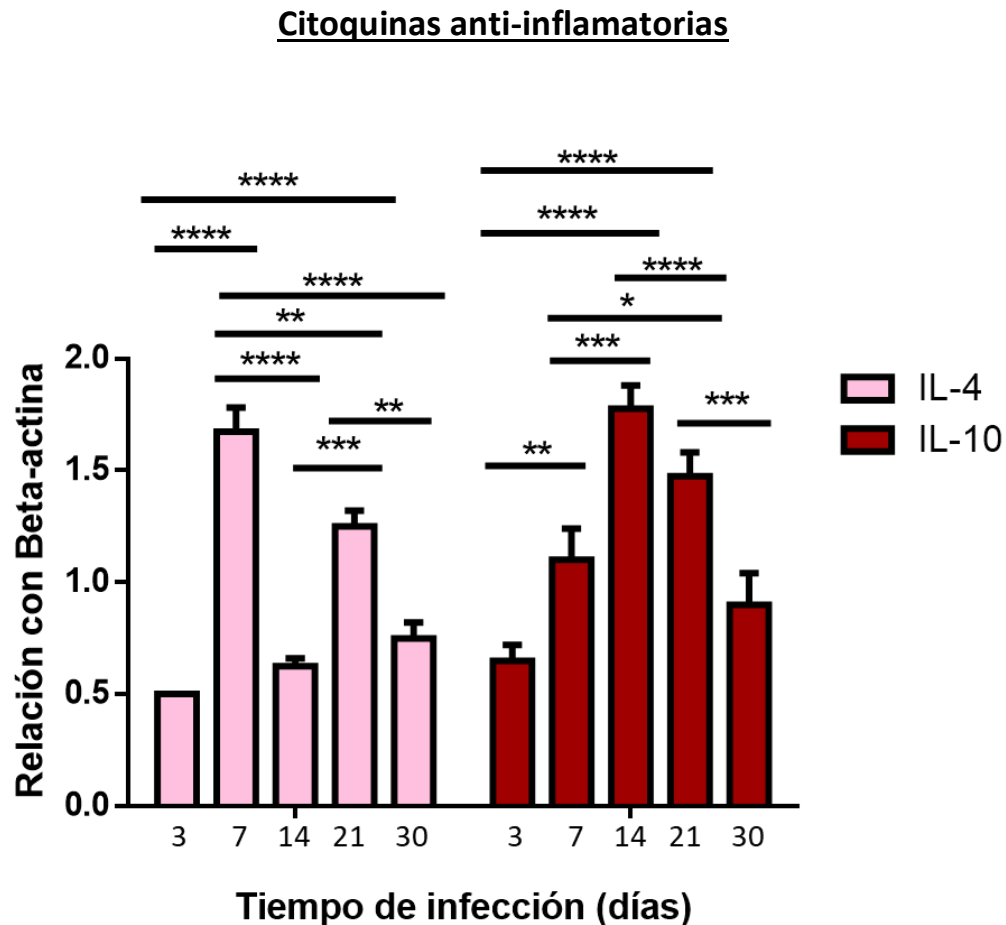


Figura 32: Análisis de la expresión del ARNm de citoquinas antiinflamatorias a los 3, 7, 14, 21 y 30 post-infección. IL-10 aumenta durante la infección en los primeros días, alcanzando un pico máximo a los 14 días, mientras que IL-4 muestra un pico a los 7 días PI, que disminuye marcadamente a los 14 días y nuevamente aumenta a los 21 días PI (****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

✓ Determinación de peroxidación lipídica a través de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbiturico (TBAR'S) en pulmón

La peroxidación lipídica es consecuencia del aumento del estrés oxidativo en el pulmón debido a la infección por *H. pylori*. En un proceso inflamatorio del pulmón, existe una excesiva producción de radicales libres y se activan mecanismos de defensa (antioxidantes), cuyo objetivo es intentar neutralizarlos; es decir, reestablecer el equilibrio. Cuando existe un exceso de los radicales libres, la neutralización no se alcanza y da lugar a un proceso de aumento del estrés oxidativo que, al no contrarrestarse, induce daño celular. Estas especies reactivas oxidan a los lípidos que forman parte estructural de las células, como también en el caso del pulmón son parte del surfactante pulmonar, conduciendo a lo que se conoce con el nombre de peroxidación lipídica.

En este ensayo, para los distintos tiempos de infección (3, 7, 14 y 21 días PI), los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR's), compuestos principalmente por malonaldehído, fueron medidos como un indicador de peroxidación. En el día 3 PI, se observó un aumento en los niveles de TBAR's en el grupo infectado en comparación con el grupo control. Resultados similares fueron visualizados para los días 7 y 21. Sin embargo, en el día 14, no hubo diferencia significativa entre ambos grupos (Fig. 33). El estrés oxidativo sería mayor al día 21 PI, incrementando el daño oxidativo de los lípidos estructurales y funcionales en pulmón.

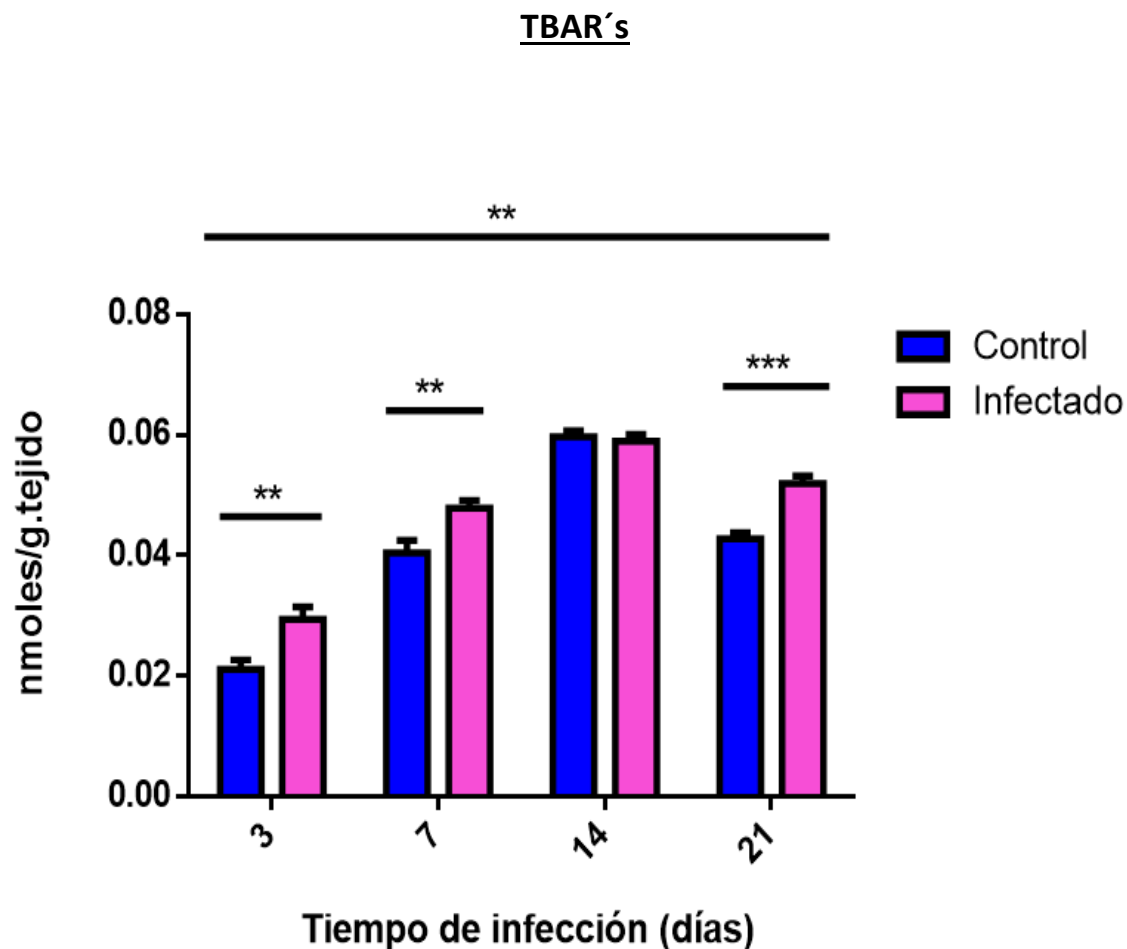


Figura 33: Estrés oxidativo en pulmón: TBAR's. La figura muestra los valores de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBAR's) como indicador de la peroxidación lipídica en los pulmones de los grupos control (C) e infectado (I) con *H. pylori*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y se representan como media \pm DE. La concentración de TBAR's en ratones infectados aumenta significativamente entre los 3 y 7 días comparado con el grupo control. No hubo diferencia significativa entre los grupos C e I a los 14 días; mientras que, en el día 21 PI, los niveles de TBAR's fueron significativamente mayores en el pulmón de los ratones infectados (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$).

✓ Determinación de Catalasa (CAT) en pulmón

Se planteó la determinación de la enzima Catalasa en los diferentes tiempos de infección de la actividad de catalasa, enzima del sistema antioxidante. Esta enzima mostró un aumento de los valores en los grupos infectados correspondiente a los días 3, 7 y 21, mientras que en el día 14 no se observó diferencia significativa entre los grupos analizados (Fig. 34). El incremento de CAT estaría indicando un aumento de los peróxidos en este modelo experimental producto de la infección.

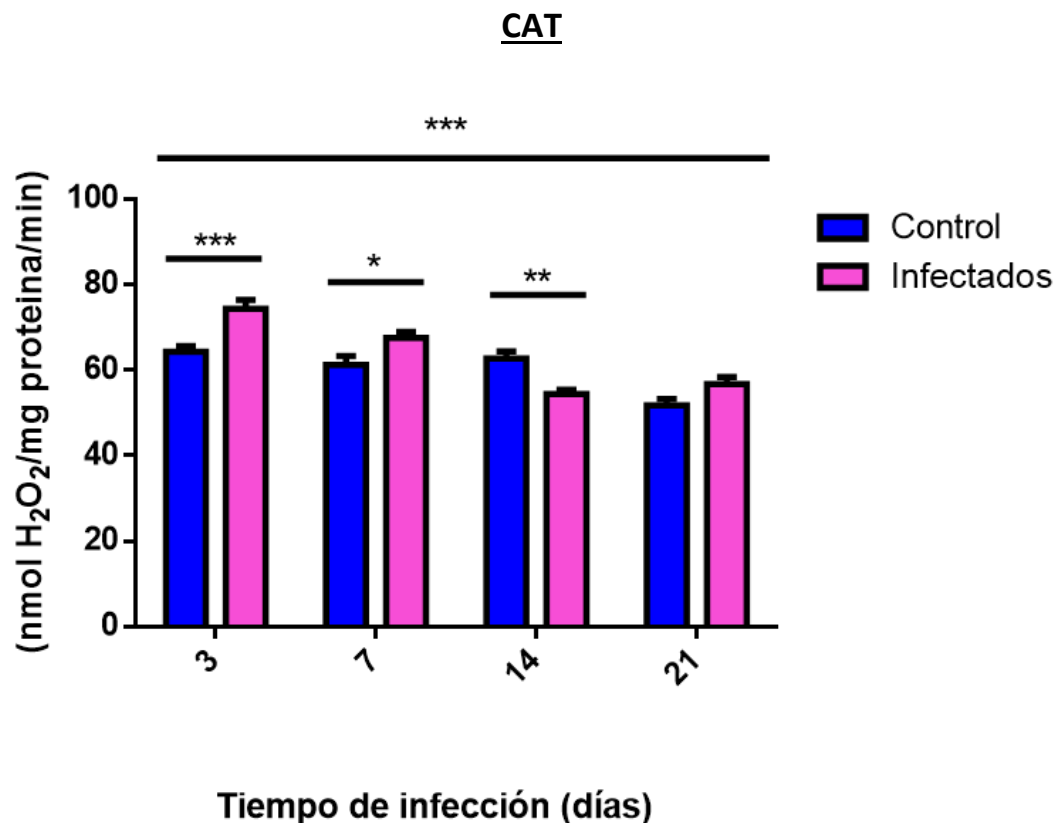


Figura 34: Efecto de los diferentes periodos de infección (3, 7, 14, 21 y 30) con *H. pylori* sobre la actividad de la enzima Catalasa. Un aumento se observó a los 3, 7 y 21 días PI. No se observó diferencia significativa en el día 14 en comparación con el grupo control (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

✓ Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS)

La expresión de la enzima Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) aumenta gradualmente durante los primeros días de infección con un pico máximo a los 14 días PI, disminuyendo a los 30 días (Fig. 35). El aumento de esta enzima inducible estaría indicando que en esta infección habría un aumento del estrés nitrosativo que induciría a la nitración de proteínas que conducen a un marcado daño tanto estructural como funcional del órgano.

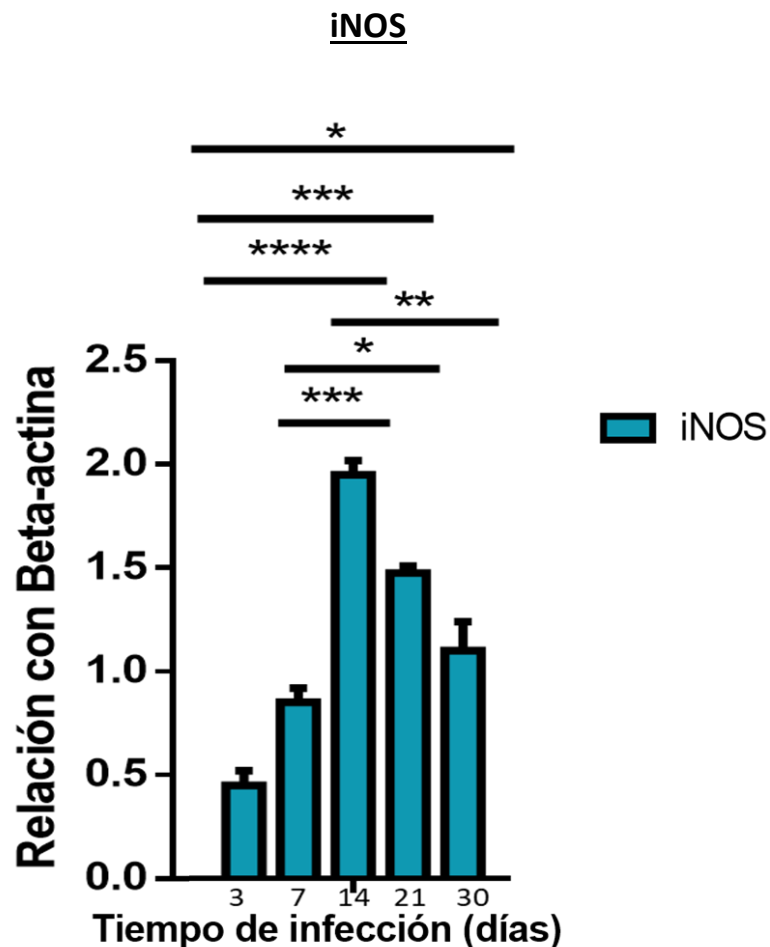


Figura 35: Efecto de los diferentes periodos de infección (3, 7, 14, 21 y 30) con *H. pylori* sobre la expresión de la enzima iNOS. Se observó un aumento significativo de la expresión de la enzima al día 14 PI. Posteriormente disminuye, pero los valores se mantienen altos en comparación con los primeros tiempos de infección (3 y 7 días) (****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

✓ Metaloproteasa 9 (MMP-9)

La cinética de la expresión de la metaloproteasa 9 (MMP-9) mostró un aumento de la expresión a los 7 días PI que continuó con una alta variabilidad a partir de los 14 días, lo que probablemente indicaría que el estroma del órgano sufre cambios importantes en ese periodo (7 a 14 días), que llevan a un cuadro inflamatorio (Fig. 36).

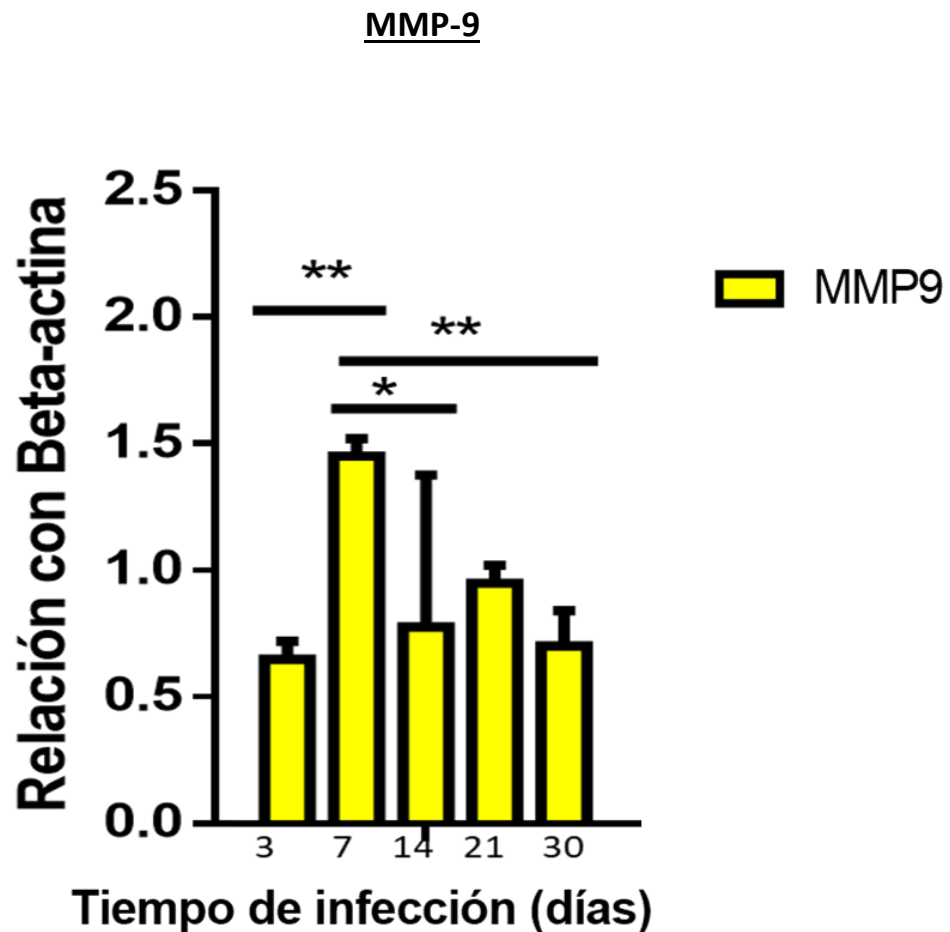


Figura 36: Efecto de los diferentes periodos de infección (3, 7, 14, 21 y 30) con *H. pylori* sobre la expresión de la enzima MMP-9. La expresión de MMP-9 tiene un pico máximo a los 7 días PI, a partir del cual presenta un comportamiento fluctuante, disminuyendo al día 14 y volviendo a aumentar posteriormente (**: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

✓ Fosfocolina citidiltransferasa (CCT)

La enzima Fosfocolina citidiltransferasa (CCT) cumple un papel importante como limitante para la síntesis de fosfatidilcolina. Es uno de los parámetros necesarios para evaluar el compromiso de la función pulmonar como consecuencia de la infección producida. Esta enzima aumentó su expresión desde el día 7 PI con una expresión máxima a los 21 días (Fig. 37).

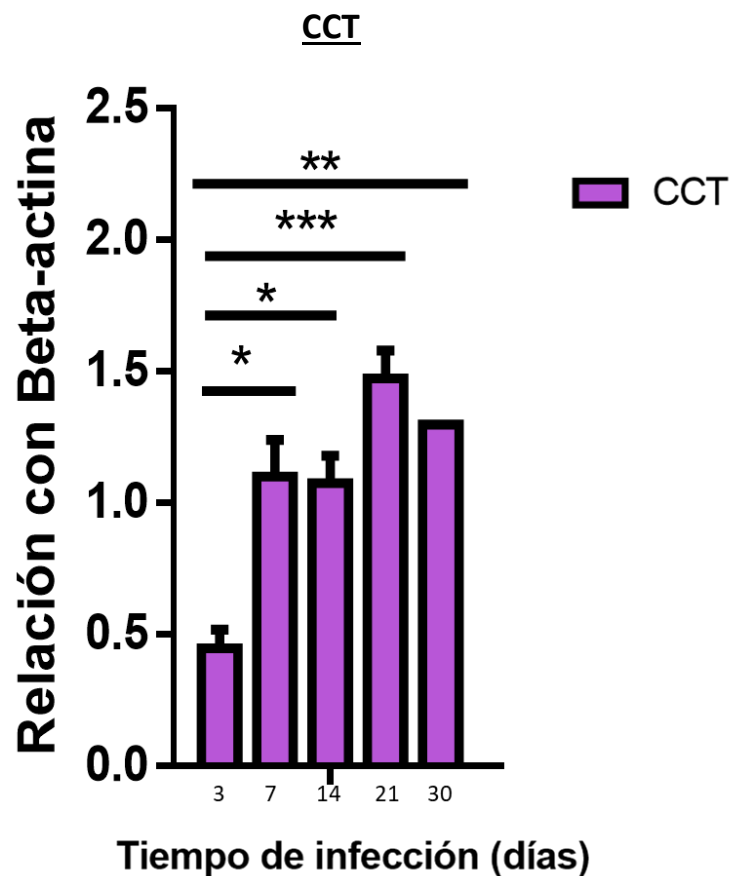


Figura 37: Efecto de los diferentes periodos de infección (3, 7, 14, 21 y 30) con *H. pylori* sobre la expresión de la enzima CCT. La expresión de CCT comienza a aumentar en el día 7 posterior a la infección, MMP-9 tiene un pico máximo a los 7 días PI, y luego en el día 21 tiene su pico máximo de expresión (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

✓ Cambios histopatológicos en pulmón

Para estudiar el impacto de la infección por *H. pylori* en el pulmón, se realizó el análisis histológico de las muestras de este órgano extraídos de forma aséptica, en ambos grupos de ratones controles e infectados en todos los tiempos de infección (3, 7, 14, 21 y 30 días PI). Las muestras fueron fijadas y procesadas, realizándose a continuación diferentes tinciones: **1) Hematoxilina&Eosina (H&E); 2) Ácido peryódico de Schiff (PAS); 3) Tricrómico de Masson.**

1) H&E

A los 3 días PI, se identificó en el tejido pulmonar una infiltración de PMN alrededor del árbol bronquial (Fig. 38). A los 7 días PI se observaron cambios morfológicos a nivel del parénquima con fusión de alvéolos manteniendo la infiltración de PMN alrededor del árbol bronquial (Fig.39). El daño del pulmón evoluciona a medida que transcurre el tiempo de infección, así a los 14 días hay un aumento de la infiltración, se puede identificar el comienzo de un proceso fibrótico con fuerte trasvasación de leucocitos (Fig. 40). A los 21 días, se detectan espacios no funcionales, mientras que a los 30 días se puede ver que el tejido pulmonar presenta una marcada fibrosis y hay aumento de la fragilidad vascular. Sumado a ello, los macrófagos que se visualizan en los distintos tiempos presentan vesículas en su interior (Fig. 41, 42 y 43).

Además, a los 3 días de infección, se detecta la presencia de bacilos curvos característicos de *H. pylori* alrededor de las células fagocíticas o en la luz de los alvéolos (Fig. 44).

Parénquima pulmonar de animal control

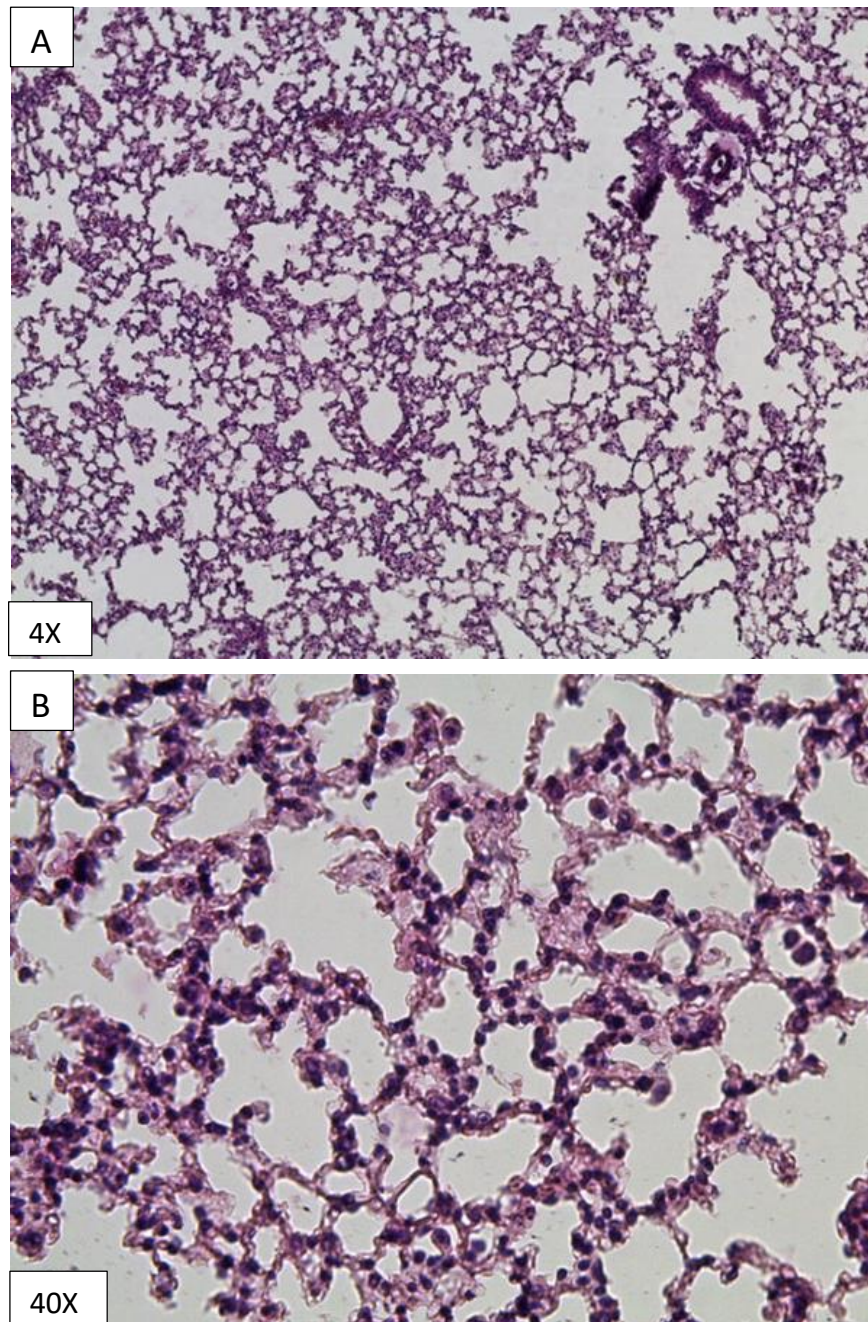


Figura 38: Cortes histológicos de pulmón de animal control, teñidos con H&E. A y B) Se visualizó un parénquima pulmonar correctamente ordenado, sin ningún tipo de alteración del tejido o índices de procesos inflamatorios. 4X y 40X.

Parénquima pulmonar a los 3 días post-infección

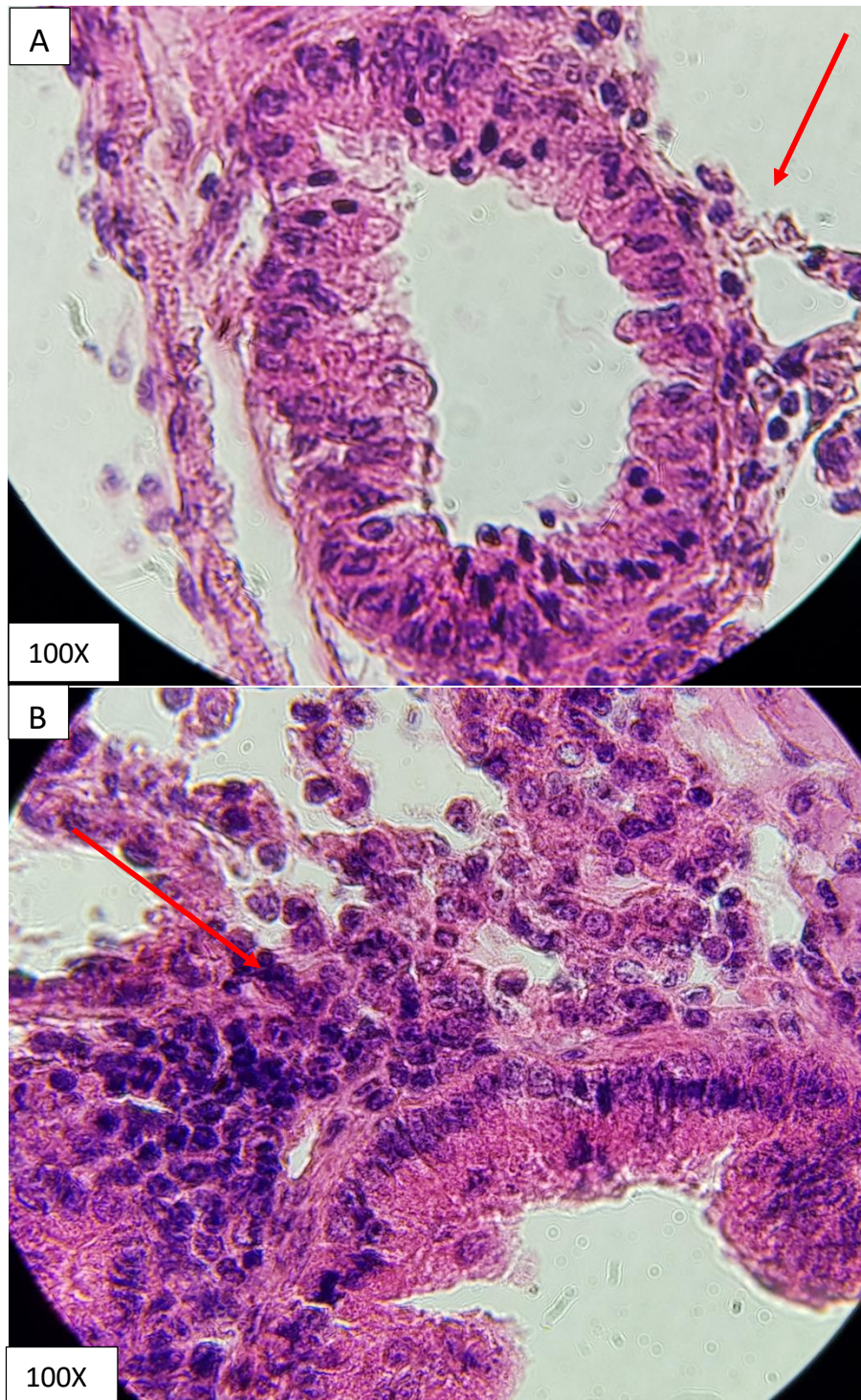


Figura 39: Cortes histológicos de pulmón, a los 3 días, teñidos con H&E. Se visualizó el comienzo de infiltración de células sanguíneas, que se acumulan alrededor del árbol bronquial. El epitelio bronquial se muestra alterado. 100X.

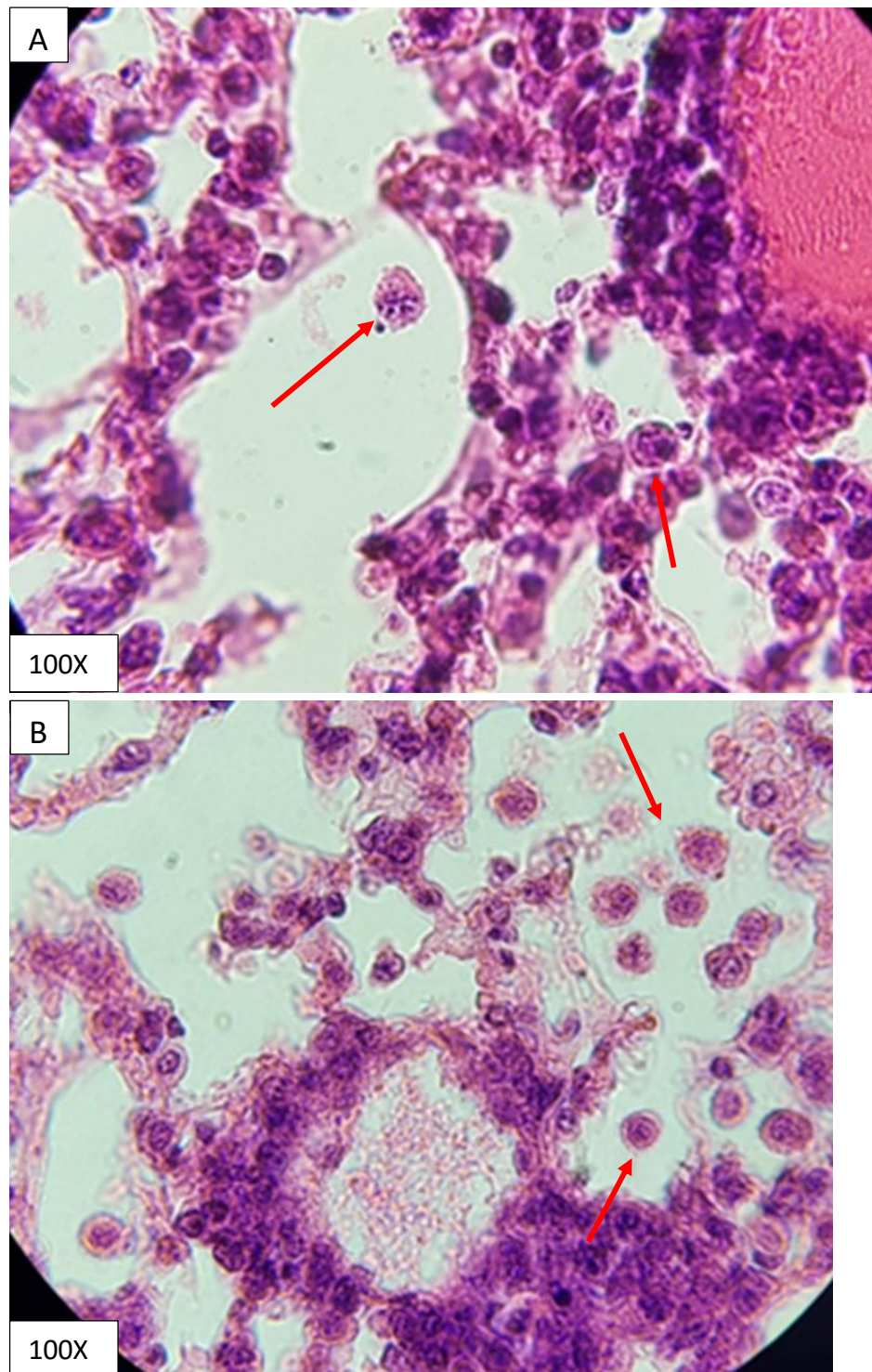
Parénquima pulmonar a los 7 días post-infección

Figura 40: Cortes histológicos de pulmón, a los 7 días, teñidos con H&E. El fenómeno inflamatorio se va incrementando, acompañado de una desorganización del estroma. También se incrementa la presencia de macrófagos (flechas rojas), los cuales se encuentran distribuidos en todo el parénquima. 100X.

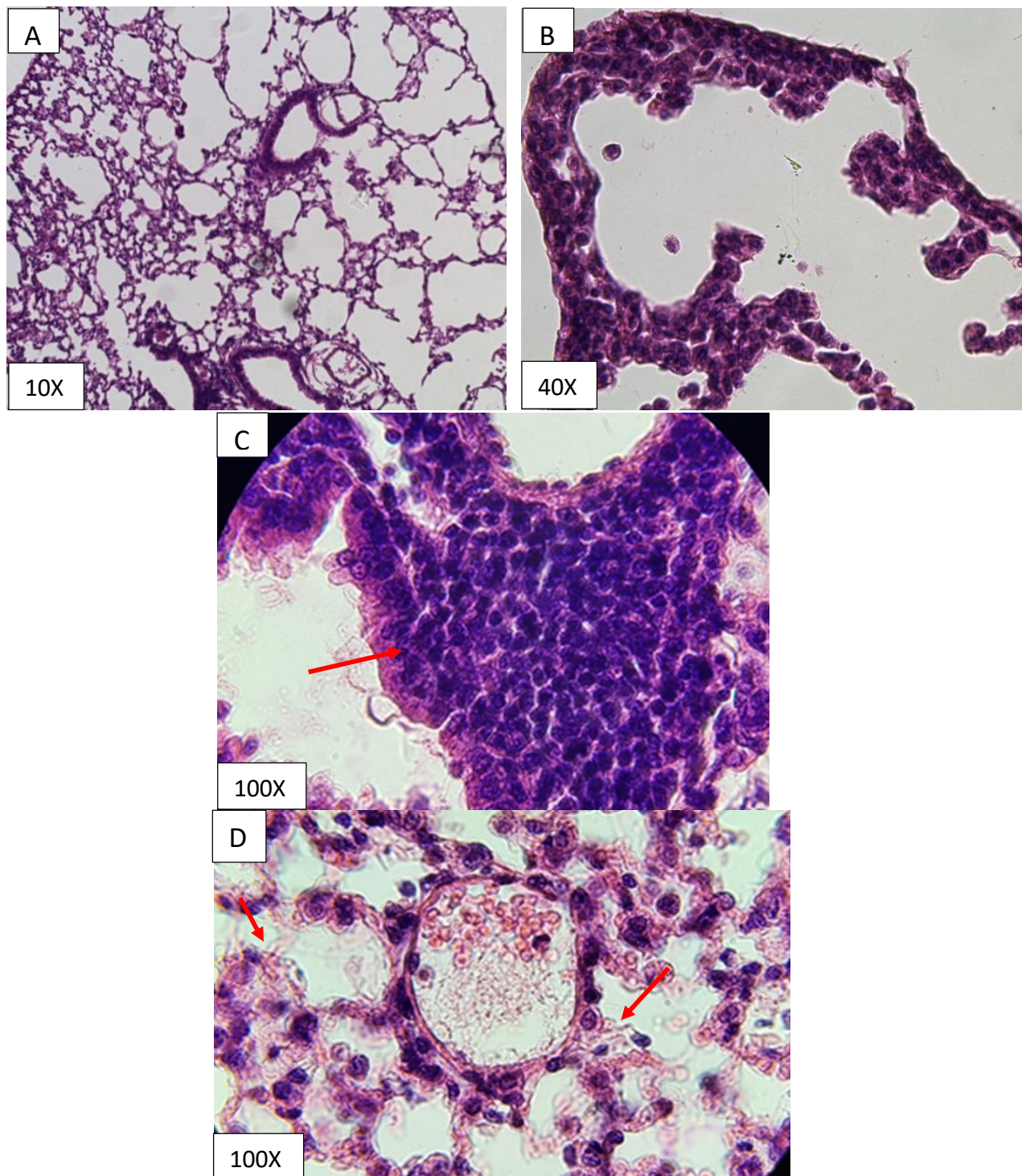
Parénquima pulmonar a los 14 días post-infección

Figura 41: Cortes histológicos de pulmón, a los 14 días, teñidos con H&E. Se puede observar que continúa aumentando la infiltración celular, que compromete fuertemente al parénquima pulmonar. Hay una marcada trasvasación de leucocitos (flechas rojas). 100X.

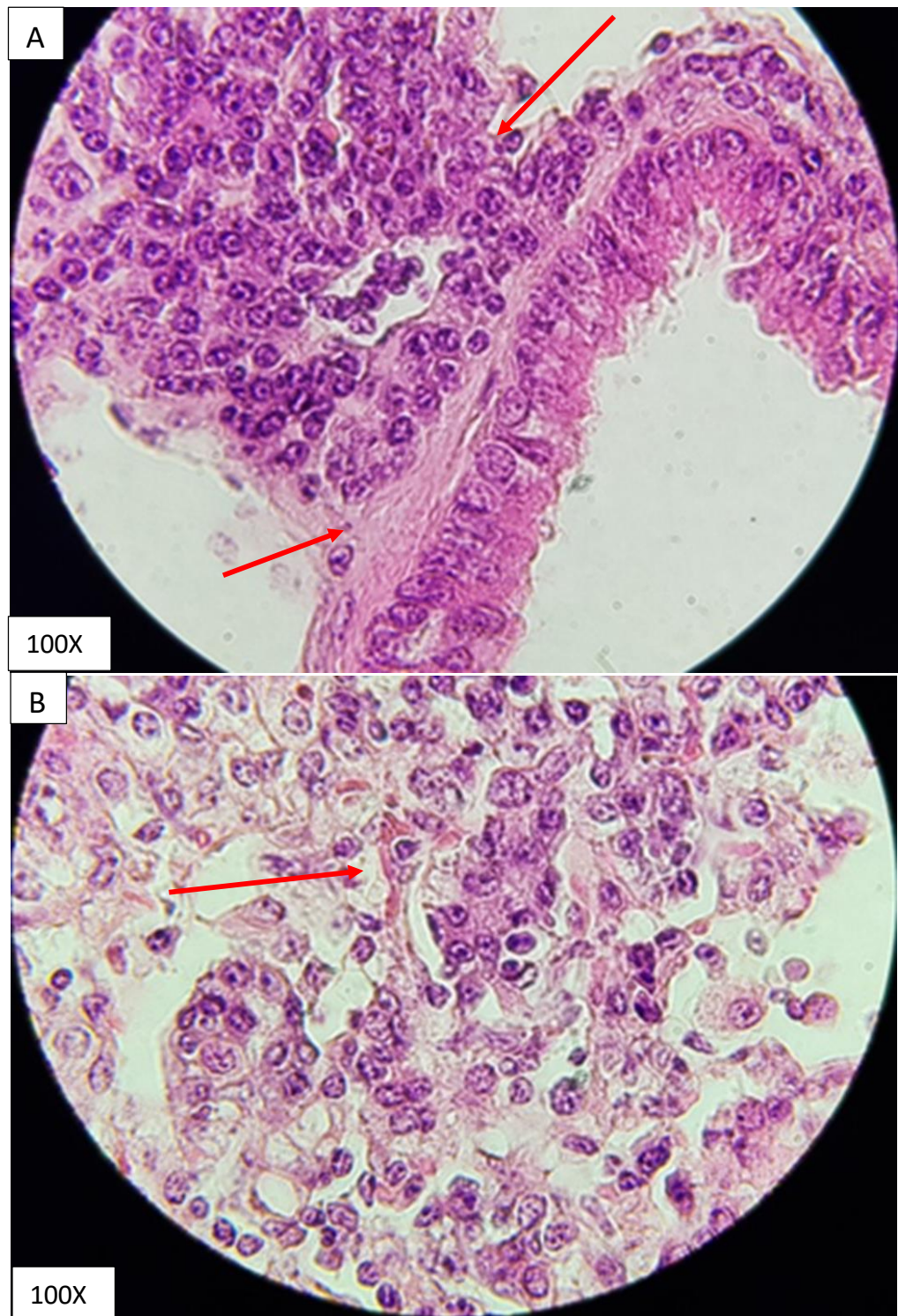
Parénquima pulmonar a los 30 días post-infección

Figura 42: Cortes histológicos de pulmón, a los 30 días, teñidos con H&E. Se visualiza una infiltración marcada, con un aumento de macrófagos en el parénquima, los cuales se pueden visualizar vesículas en su citoplasma. También hay un aumento de la fragilidad vascular (B), como así un aumento del tejido conectivo, presentando una incipiente fibrosis. 100X.

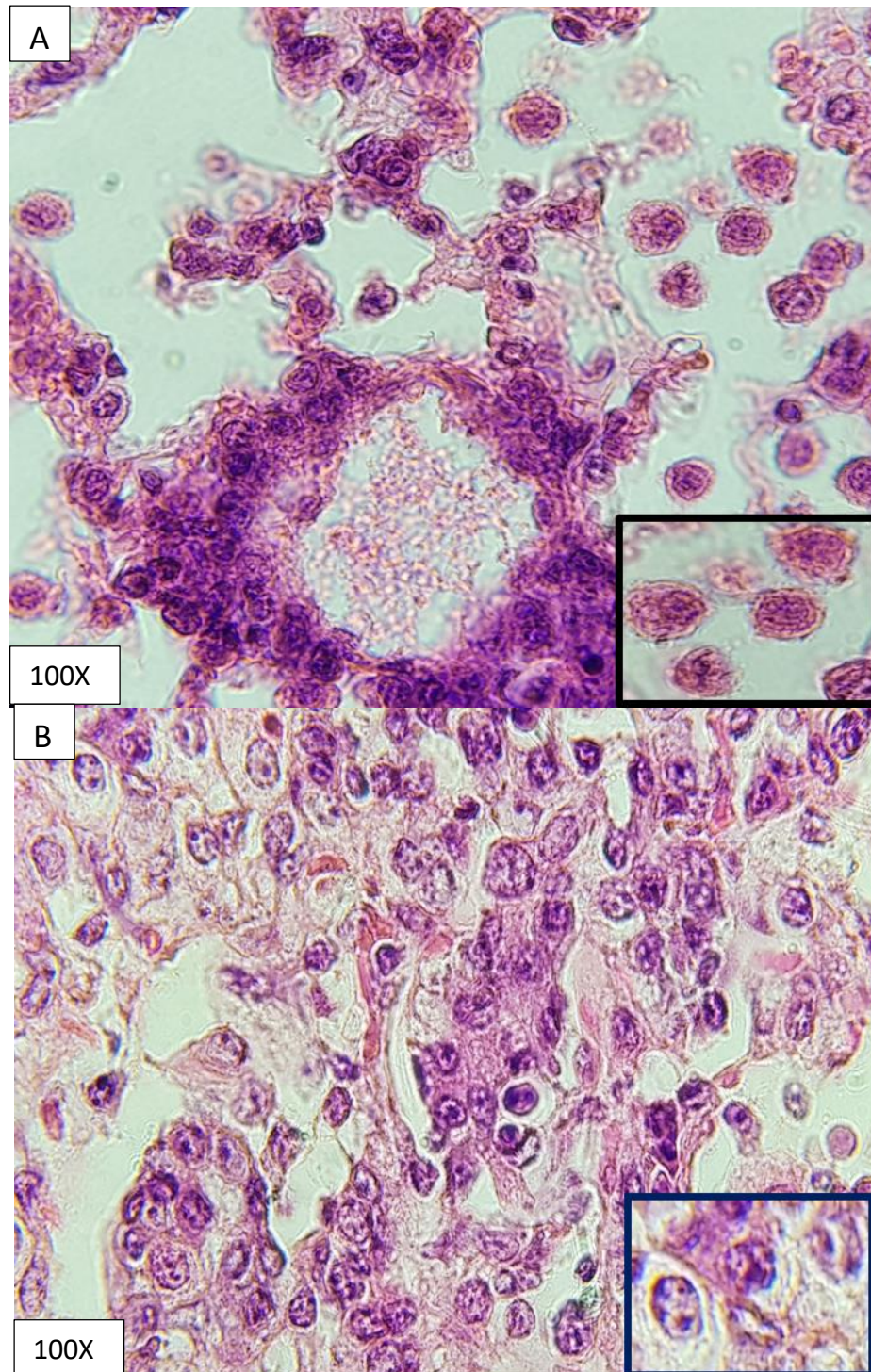
Comparación Hematoxilina&Eosina a los 7 y 30 días

Figura 43: Comparación H&E a los 7 y 30 días. Imágenes de dos puntos de la experiencia **A)** a los 7 días y **B)** a los 30 días. En ambos casos tal como lo muestran los inset, se ve claramente la presencia de macrófagos activos, con “elementos” en su interior. Además, se puede visualizar la actividad inflamatoria con un estado inflamatorio que avanza, con incremento del tejido conectivo en la parte central y con fragilidad vascular. 100X

Parénquima de pulmón a distintos tiempos de infección

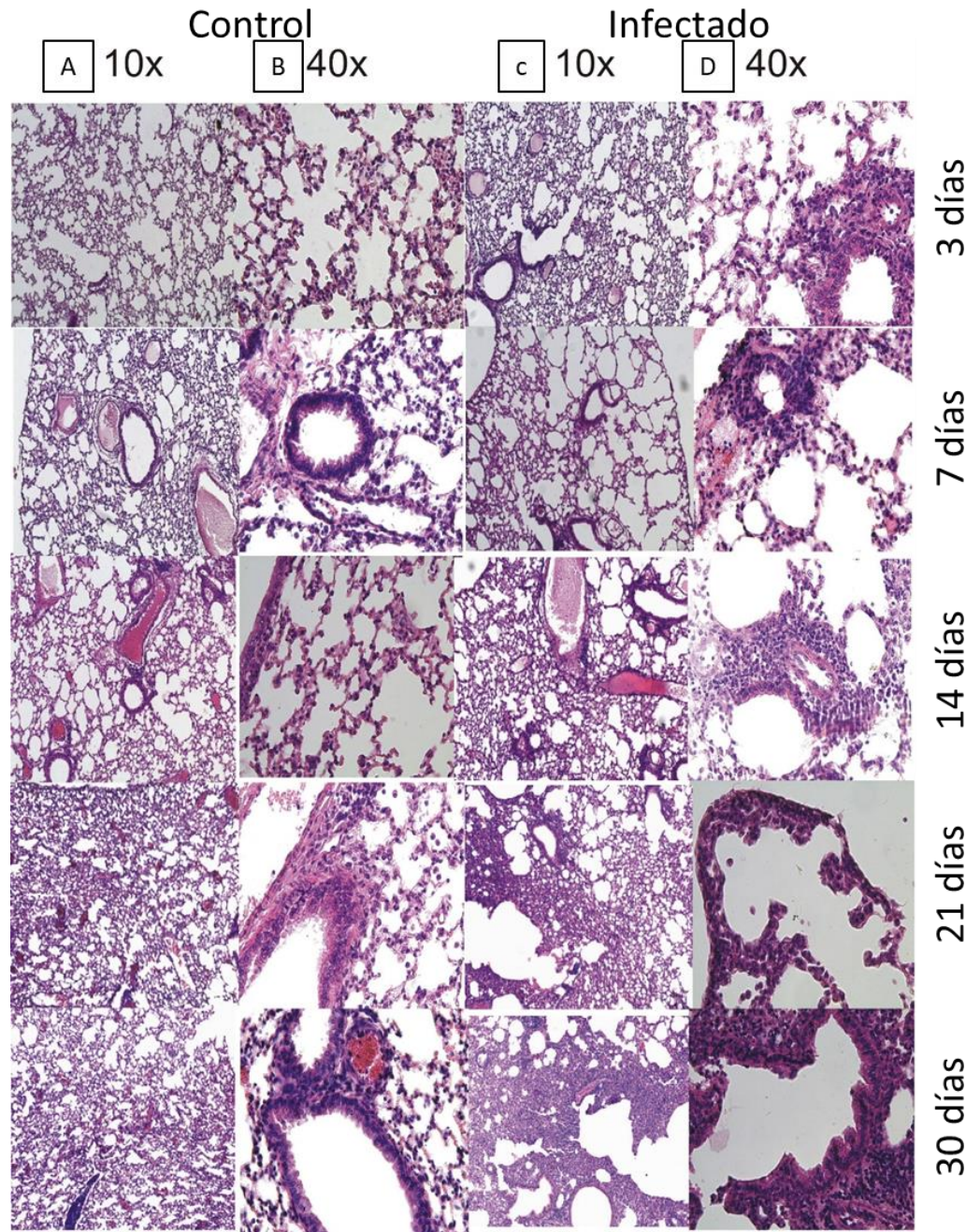


Figura 44: Tinción de H&E de los cortes histológicos de pulmón. Cortes histológicos de los grupos infectados y control, a los 3, 7, 14, 21 y 30 días post-infección. Las columnas A y B corresponden a los ratones control, mientras que C y D a los infectados. A medida que transcurre el tiempo, se puede observar infiltración de PMN que rodea a los bronquios, bronquiolos y se va extendiendo por todo el estroma del órgano. Además, sobre todo a nivel del día 22 y 30 PI se presentan cambios en la estructura del pulmón, como es la fusión de los alvéolos y proceso fibróticos. 10X y 40X.

Hematoxilina&Eosina a los 3 días de infección

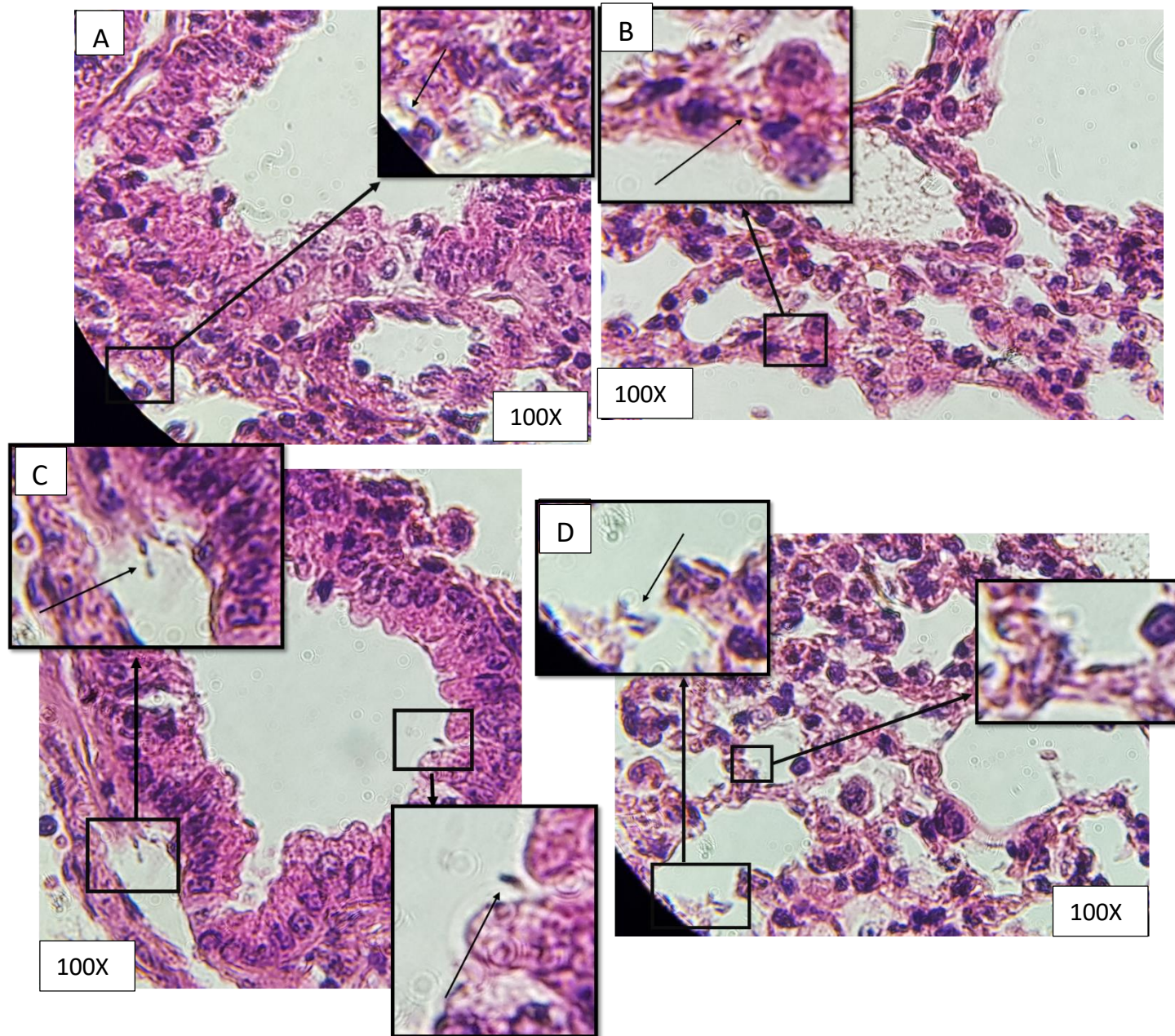


Figura 45: Cortes histológicos a los 3 días de infección teñidos con H&E. En las imágenes se pueden observar distintos cortes del día 3 de infección, donde en los inset se amplía las estructuras similares a *H. pylori* y que no forman parte del tejido pulmonar. Algunas de ellas se pueden ver a la luz de los alvéolos (C), mientras que otras están en distintas partes del parénquima del órgano (A, B y D). 100X.

2) Identificación de macrófagos por PAS

La tinción con PAS mostró una marcada presencia de macrófagos a los 3 y 14 días PI, con un incremento durante el tiempo de infección (Fig. 45).

Identificación de macrófagos por Ácido peryódico de Schiff (PAS)

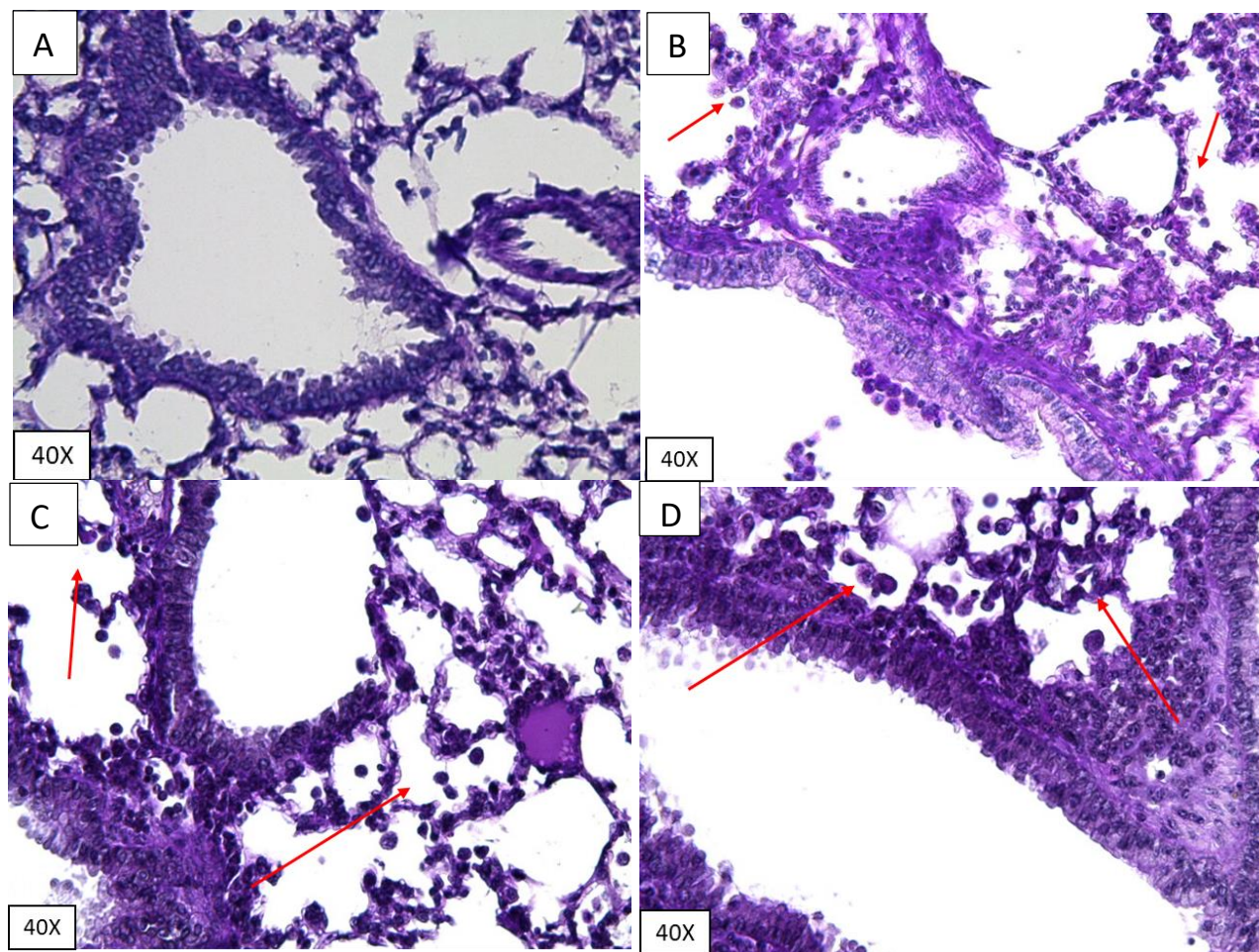


Figura 46: Tinción de PAS. A) Pulmón de un ratón control. **B)** Pulmón de ratón infectado a los 3 días PI. **C)** Pulmón de ratón infectado a los 14 días PI. **D)** Pulmón de un ratón infectado a los 30 días PI. Se puede ver que los grupos infectados, en comparación con el control van incrementando progresivamente la cantidad de macrófagos en el parénquima, desde los 3 a los 30 días luego de la infección. 40X

3) Presencia de tejido conectivo identificado por coloración Tricrómico de Masson

Es una tinción que permite visualizar tejido conectivo, el cual se tiñe de color azul y está presente alrededor del árbol respiratorio en pulmón sano. En los cortes histológicos se observó un aumento del desarrollo del tejido conectivo en el estroma pulmonar a los 3 y 7 días PI. La presencia de colágeno aumentó considerablemente a los 14 días y evidencia una fibrosis pulmonar a los 21 y 30 día (Fig. 46).

Presencia de tejido conectivo identificado por coloración Tricrómico de Masson

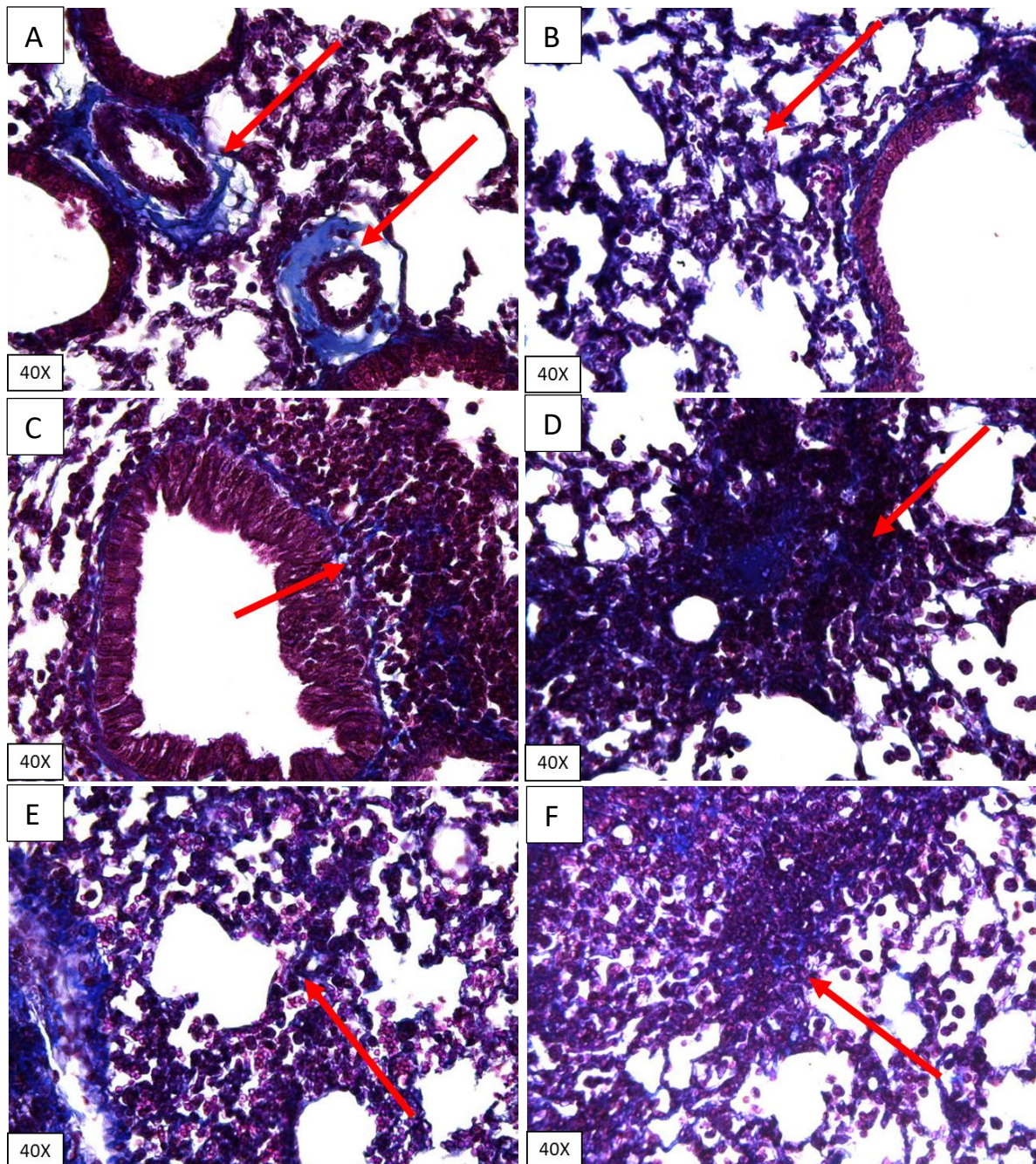


Figura 47: Parénquima pulmonar a distintos tiempos con tinción de Tricrómica de Masson. A) Pulmón de ratón control. B) Pulmón de ratón a los 3 días PI. C) pulmón de ratón a los 7 días PI. D) Pulmón de ratón a los 14 días PI. E) Pulmón de ratón a los 21 días PI. F) Pulmón de ratón a los 30 días PI. Se observa el incremento progresivo del tejido conectivo, con un efecto más marcado a los 30 días PI. 40X.

Discusión

Discusión

La mucosa gástrica ha sido reconocida como nicho natural de *H. pylori*, el cual se encuentra infectando aproximadamente al 50% de la población mundial. La habilidad que posee el microorganismo de adherirse al epitelio de la mucosa gástrica o internalizarse dentro de estas células, sumado a la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa, induce patologías tales como gastritis, úlceras pépticas, linfoma tipo MALT e incluso cáncer. Sin embargo, en la actualidad existe un aumento de artículos científicos que asocian a estos microorganismos con diferentes desórdenes extragástricos, tales como enfermedades autoinmunes, neurológicas, de la piel, hematológicas, ginecológicos y vasculares. También se lo ha asociado con infecciones respiratorias, como la enfermedad obstructiva crónica (EPOC), bronquioectasia, asma, cáncer de pulmón y bronquitis crónica, en las que la seroprevalencia del microorganismo es alta (Malfertheiner y col., 2011; Shams-Hosseini y col., 2011; Chmiela y col., 2018; Larussa y col., 2018).

El mecanismo que relaciona la infección por *H. pylori* en el desarrollo de enfermedades respiratorias no está del todo dilucidado, si bien existen tres teorías que podrían explicar (Chmiela y Gonciarz, 2017).

1) La respuesta inmune inducida por *H. pylori*. La liberación crónica de péptidos gastrointestinales (gastrina, somatostatina) y citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-1, IL-8 y TNF- α desde la mucosa gástrica tiene como consecuencia un efecto sistémico (Roussos y col., 2006).

2) Mimetización molecular. La similitud antigénica y funcional entre estructuras microbianas y moléculas del hospedador lleva a la producción de anticuerpos autoreactivos, contribuyendo al desarrollo de enfermedades autoinmunes. El rol patogénico de *H. pylori* en las enfermedades podría deberse a una activación anormal de mediadores inflamatorios y/o la inducción de autoinmunidad (Roussos y col., 2006; Malfertheiner y col., 2011; Chmiela y Gonciarz, 2017).

3) La aspiración o inhalación de la bacteria en las vías respiratorias. El contenido gástrico en el cual se encuentra presente *H. pylori* puede alcanzar fácilmente las vías

respiratorias a través del reflujo gastroesofágico, colonizando el sistema respiratorio y causando un daño directo y la inflamación crónica de dichas vías (Deng y col., 2013; Samareh Fekri y col., 2014; Chmiela y Gonciarz, 2017).

Es bien conocido, que la localización gastrointestinal de *H. pylori* se atribuye a que posee ciertas “ventajas protectoras” contra ambientes altamente ácidos, sin embargo, todavía se desconoce si poseería alguna ventaja en el tracto respiratorio (tanto superior como inferior). Toda la información disponible acerca de la infección por *H. pylori* en los pulmones está basada en estudios epidemiológicos o estudios de casos, en los cuales existe discrepancia, vinculadas a la diferencia de las características de los pacientes y la diversidad de métodos utilizados en la detección de la bacteria. Sumado a esto, la mayoría de los estudios han sido orientados en demostrar la asociación entre *H. pylori* y las enfermedades respiratorias y en entender la patogénesis de estas enfermedades, hipotetizando que la infección gástrica de *H. pylori* inicia una respuesta inmune sistémica que tiene un impacto en el pulmón de los pacientes susceptibles (Kreuter y col., 2016). Así, existen estudios realizados a partir de muestras de la mucosa o las vías respiratorias superiores de personas que padecían enfermedades como sinusitis, hipertrofia adenotisular, faringitis y laringitis, en las que se pudieron identificar la presencia de ADN de *H. pylori* mediante PCR o la presencia de proteínas del microorganismo reconocidas por inmunohistoquímica (Borkowski y col., 1997; Cirak y col., 2003; Morinaka y col., 2003; Elsheikh y Mahfouz., 2005; Angrill y col., 2006; Bulut y col., 2006; Kaptan y col., 2009; Lin y col., 2011; Wibawa y col., 2011). Mientras que, la vinculación de la bacteria con las vías respiratorias inferiores se ha llevado a cabo mediante estudios serológicos de personas con problemas respiratorios tales como bronquitis crónica, EPOC, tuberculosis y asma (Caselli y col., 1999; Tsang y col., 2000; Filippou y col., 2002; Jun y col., 2005; Kanbay y col., 2005; Roussos y col., 2005; Jun y col., 2006; Fullerton y col., 2009).

Hasta la fecha, sólo se dispone en la bibliografía de un trabajo de investigación que refiere el intento de aislar *H. pylori* a partir de biopsias de pacientes con bronquioectasia en medios selectivos, sin éxito alguno (Ilvan y col., 2004). En los resultados obtenidos en esta tesis, una vez ocurrida la infección de *H. pylori* en el pulmón, el microorganismo sólo pudo ser recuperado del tejido hasta el día siete después de la infección (Fig. 23 A, B y C). El hecho

de que *H. pylori* no pueda ser recuperado en días posteriores a la infección, podría deberse a que existe una disminución de la carga bacteriana durante el proceso de atrofia del pulmón, que se observa en los días 21 y 30 PI. Esta atrofia en el pulmón crea un ambiente hostil para *H. pylori*, en el que no puede persistir y por lo tanto no puede recuperarse a partir de cultivos. Sumando a ello, investigadores han reportado que cuando *H. pylori* es fagocitado por los macrófagos, ingresa en el fagosoma y se forma el megasoma. Las bacterias contenidas dentro de ambas organelas tienen un aspecto cocoide, las cuales son viables, pero no cultivables; así, sólo se ha recuperado el microorganismo en cultivo a partir de macrófagos después de 24 h de infección (Borlace y col., 2011). En coincidencia, en los resultados obtenidos del análisis de la tinción H&E al día 3 PI, se observan bacilos con morfología helicoidal característico de *H. pylori* ubicados en la proximidad de las células fagocíticas. Además, de acuerdo con la mayor presencia de macrófagos activos en días posteriores a la infección, no se observan bacterias en el tejido analizado (Fig. 38 y 44).

Respecto a la detección molecular de *H. pylori* a partir de tejido pulmonar, en este trabajo se observó una banda intensa correspondiente a la amplificación del gen ARNr 16S, en los primeros tiempos (3, 7 y 14 días) de infección, mientras que a los 21 días mostró una banda débil y no hubo amplificación al día 30 PI (Fig. 23 D). Resultados similares fueron obtenidos por Sonnenberg y col. (2010) para la detección de *H. pylori* en biopsias gástricas, usando inmunohistoquímica, en la cual los autores no detectaron microorganismos en la mucosa gástrica con inflamación crónica activa. En este sentido, Karnes y col. (1991), propusieron que una prolongada atrofia causa desaparición espontánea de *H. pylori* de la mucosa gástrica, disminuyendo el título de anticuerpos. Estos trabajos de investigación avalan los resultados obtenidos en esta tesis, ya que después de los 7 días de infección, el microorganismo no pudo ser aislado en agar sangre a partir de las muestras de pulmón. Adicionalmente, a través de las distintas determinaciones y técnicas propuestas en esta tesis, se pudo observar el daño generado en el estroma pulmonar por la presencia del microorganismo.

La asociación de *H. pylori* con distintas patologías respiratorias se llevó a cabo, en la mayoría de los estudios, mediante la determinación de títulos de anticuerpos anti-*Helicobacter* en el suero de los pacientes. Gülhan y col. (2007) intentaron detectar por PCR la presencia de *H. pylori* en muestras de pacientes con bronquiectasia, sin embargo, ninguna de las muestras dió

resultado positivo. Samareh Fekri y col. (2014) mediante PCR real time, detectaron el ADN del microorganismo sólo en el 10% del LBA proveniente de pacientes con EPOC. Similares valores fueron obtenidos por el mismo grupo de investigación a partir del LBA de pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón, utilizando la misma técnica (Samareh Fekri y col., 2016).

Por otra parte, no fue posible aislar microorganismos a partir del cultivo de muestras de GLM, luego de la infección, en ninguno de los tiempos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Taniguchi y col. (2017), quienes infectaron de forma gástrica a ratones BALB/c con el microorganismo *Helicobacter cinaedi*, obteniendo una colonia sólo en la primera semana de infección y no lograron aislarlo de estos órganos en las 2, 3 y 4 semanas siguientes a la infección. Si bien una de las teorías que se maneja para explicar la presencia de *H. pylori* en pulmón es una infección sistémica, hasta el momento no se han realizado estudios tendientes a la búsqueda del microorganismo en estos órganos.

Este trabajo de tesis aporta al conocimiento de los efectos a nivel pulmonar como consecuencia de la infección en el órgano inducida por la inoculación orotraqueal del microorganismo. Así, en las imágenes histológicas se observa la presencia de PMN y macrófagos alrededor del árbol respiratorio.

Se plantea que el aislamiento de *H. pylori* a partir de la muestra estomacal suele ser complicado y tedioso, condicionado por el tipo de muestra, la distribución del patógeno en la zona muestreada y la presencia de otros microorganismos (Sabbagh y col., 2018). En nuestro estudio, el estómago de animales tanto controles como infectados se analizó por cultivo en agar sangre, sin crecimiento del microorganismo en ninguno de los tiempos PI. Sin embargo, siguiendo el protocolo de Awaad y col. (2017) se visualizó la presencia de úlceras en el estómago de ambos grupos. Esto podría deberse a que el microorganismo alcanza el tejido gástrico teniendo en cuenta la vía de infección utilizada en este trabajo (orotraqueal).

En este trabajo de tesis se evaluó el índice de inflamación como marcador de edema pulmonar comparando la diferencia de peso obtenidos tanto de los pulmones del grupo control como del infectado. En los resultados obtenidos, se pudo observar que la infección con *H. pylori* en el pulmón de los ratones no produjo la movilización de agua hacia el estroma del órgano,

en los primeros días de infección. A los 21 días se determinó un pequeño incremento de esta relación en comparación con los controles, siendo más notorio a los 30 días PI. Sin bien, la bibliografía da cuenta de estudios previos realizados en ratones infectados con este microorganismo, donde se evaluó este parámetro, los mismos no se realizaron con una cinética de seguimiento, con los tiempos de infección empleados en este trabajo. No obstante, Chen y col. (2017) obtuvieron 24 h PI un aumento del índice inflamatorio de los pulmones, cuando a los ratones se les administraba una proteína de choque térmico. Feng y col. (2016) también obtuvieron un aumento de la relación en ratones infectados con *Pseudomona aeruginosa* luego de 72 horas PI. En cambio, en ratones infectados con el virus de la neumonía murino mostraron, para los primeros días de infección, una relación similar entre los grupos controles e infectados, aumentando en el día 6 con un valor máximo al día 8 PI (van den Berg y col., 2014).

En el proceso inflamatorio se considera que I-CAM y V-CAM están involucrados en los pasos iniciales de la interacción endotelio-leucocitos, siendo cruciales para la adhesión de los mismos y migración al espacio sub-endotelial. Adicionalmente, TNF- α aumenta la expresión de I-CAM1, que media la trans migración de leucocitos reclutados en el tejido próximo. A los 7 días PI, ambos marcadores de disfunción endotelial I-CAM, como V-CAM aumentaron marcadamente la expresión en los pulmones de ratones infectados con *H. pylori* manteniendo estos niveles hasta el día 21 PI (Fig. 25). Estas citoquinas son consideradas como biomarcadores de confianza de la activación endotelial y están relacionadas con una alta movilidad de células de defensa.

En cuanto a la determinación de proteínas en LBA, la infección con *Yersinia enterocolitica* induce un aumento en los valores de las proteínas en LBA de ratones infectados a los 21 días, mientras que en los primeros días de infección el aumento no es significativo (Gutiérrez y col., 2008). Esto concuerda con los resultados obtenidos para el estudio de infección con *H. pylori*, donde a los 3 y 7 de días PI no se observó un incremento de las proteínas, en ratones infectados respecto al control. Si bien hay una disminución de la concentración en el grupo de ratones infectados al día 14, se mantiene constante hasta los 30 días PI. Por lo que podemos concluir que si bien, otros marcadores dan cuenta del proceso inflamatorio, este proceso infeccioso en particular, no produce extravasación de proteínas, hacia el espacio alveolar.

Para evaluar daño celular se determinaron los valores de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). En este modelo experimental, a partir de los LBAs obtenidos de ratones controles e infectados se determinó LDH, observándose un aumento gradual de los valores, a medida que avanzaba el tiempo de infección, con valores próximos a las 400 U/I a los 21 días PI, (aproximadamente el doble del valor obtenido para el grupo de controles). Al comparar con la respuesta en pulmón, a las infecciones con *Y. enterocolitica* podemos ver que a los 21 días PI hubo un incremento de LDH, entre 100 a 200 veces más respecto de los controles (Gutiérrez y col., 2008). Por lo que podemos concluir que ambas bacterias incrementan la respuesta aproximadamente al mismo tiempo de infección, aunque las respuestas a *Y. enterocolitica* son más exacerbadas. Por lo que, en ambos modelos experimentales en pulmón de ratón, el daño celular aumenta a medida que aumenta el tiempo PI, lo que indica que la injuria al parénquima pulmonar se agrava, a medida que avanza el tiempo.

Sumado a ello, estudios realizados a pacientes con reflujo gastroesofágico y que padecían fibrosis pulmonar idiopática; mostraron altos niveles de LDH, tanto en suero, como en LBA. Esto conduce a plantear una posible asociación entre ambas patologías (Vukovac y col., 2014).

La toxina VacA aumenta la inflamación de la mucosa inducida por *H. pylori* en el estómago humano, provocando una necrosis programada de las células epiteliales gástricas y la posterior liberación de proteínas proinflamatorias, contribuyendo a la patogénesis del cáncer gástrico y la úlcera péptica (Radin y col., 2011). Estos autores, determinaron LDH comparando las células infectadas con una cepa de *H. pylori* VacA positivo y una mutante negativa en donde los niveles de LDH liberados fueron elevados para la cepa VacA (+) y negativos para la mutante (Radin y col., 2011). En esta investigación, la cepa de *H. pylori* (NCTC 11638) con la que se trabajó es VacA (+), por lo que se podría considerar que los elevados valores obtenidos pueden deberse a la presencia de este factor de virulencia. Más aún, cuando la enzima LDH es un marcador para la inflamación local, daño celular y necrosis.

Los macrófagos son una de las primeras células en dar lugar a una respuesta inmune, cuando hay una infección. El análisis del LBA mostró una leve disminución de la viabilidad de los macrófagos al tercer día de infección, que se sostiene en los tiempos PI y disminuye significativamente a los 30 días. La tipificación de la población celular mostró la presencia

de linfocitos, pocos PMN y una disminución de macrófagos en el grupo de ratones infectados respecto al control. Estos resultados son consistentes con Gutiérrez y col. (2008) quienes observaron en ratones C57BL/6 wild type (WT) infectados con *Y. enterocolitica* que la viabilidad celular disminuía levemente a los 3 días post-infección, con una disminución significativa a los 21 días PI. En este caso, la tipificación celular del LBA mostró un incremento del número de linfocitos, pocos PMN y un valor constante de macrófagos. *H. pylori* cuando es fagocitado puede evadir los mecanismos implicados en el estallido respiratorio del macrófago y promueve la muerte del mismo. La viabilidad de esta célula de defensa declina luego de que *H. pylori* es engullido y fagocitado, pero los factores de la bacteria responsable de este proceso, no están identificados (Allen, 2007). Sumado a ello, se ha visto que en la infección gástrica por *H. pylori* existe un reclutamiento y aumento en el número de linfocitos, los cuales inducen la síntesis de iNOS (Ramarao y col., 2000; Cherdantseva y col., 2014). En este trabajo, la cinética de expresión de esta enzima va en aumento, desde el día 3 de infección; lo que podría explicar la diferencia en el número de linfocitos en ratones infectados, respecto al control (Fig. 35).

En cuanto a la expresión de las distintas citoquinas, Lappalainen y col. (2005) demostraron que IL-1 β es suficiente para inducir la inflamación del pulmón, agrandamiento de los espacios aéreos distales, metaplasia del mucus y adelgazamiento de la vía aérea y fibrosis en el ratón adulto. Además, IL-1 β aumenta la producción de las metaloproteasas MMP-9 y MMP-12. Las MMPs son proteinasas dependientes de zinc, que participan en la degradación de la matriz extracelular, siendo estas enzimas muy importantes en la remodelación de tejido, con un rol esencial en los procesos de inflamación pulmonar (Kondo y col., 2018). Consistente con los resultados obtenidos por Lappalainen y col. (2005), los ensayos realizados en nuestro trabajo mostraron que MMP-9 aumenta, luego del incremento de IL-1 β (Fig. 31B y 36); lo que nos está indicando que hay remodelación del estroma pulmonar en este proceso.

MMP-9, es una endopeptidasa endoelástica producida por macrófagos activos del pulmón que está implicada en el desarrollo de enfisema pulmonar mediante la degradación de la pared alveolar; además se ve aumentada en la fibrosis pulmonar idiopática (King Jr y col., 2011; Li y col., 2016). En este sentido, Malik y col. (2007) observaron mediante zimograma un

aumento de MMP-9 luego de 5 días de infección por *Francisella tularensis* en el pulmón. En comparación, nuestros resultados mostraron un pico de la expresión de MMP-9 a los 7 y 21 días PI (Fig. 36).

IL-17A es la citoquina clave producida por células Th17 y actúa como mediador en la defensa inflamatoria del hospedador. La síntesis de la misma está estimulada por IL-1 y el mismo TNF- α (Mukhopadhyay y col., 2006). Esto se puede relacionar con los resultados obtenidos, donde se observó que, a los 3 días de infección, la expresión de IL-1 β es máxima, mientras que el aumento en la expresión de TNF- α se observa a los 7 días PI. Es decir, IL-1 β estimuló la síntesis de TNF- α (Fig. 31 A y B).

En la patogénesis de muchas enfermedades, especialmente las respiratorias, se ha planteado que “*in vitro*” como “*in vivo*”, altos niveles de TNF- α conducen a una exacerbación de la inflamación y la respuesta pro-oxidativa. Esta inflamación es clave para una cascada de eventos dependientes de TNF- α como la inducción de reacciones inflamatorias celulares que estimulan el estrés oxidativo e incrementan la expresión de varias moléculas pro-inflamatorias; que en conjunto constituyen el mecanismo de acción de TNF- α (Mukhopadhyay y col., 2006).

Diversos autores demuestran que IL-17A actúa en forma sinérgica con IL-1 β y TNF- α para manejar el ambiente inflamatorio y además estimular la liberación de IL-8 en las células epiteliales (Ji y col., 2014). Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la expresión de IL-17 luego de 7 días PI, coincidentemente con los obtenidos por otros autores en pacientes infectados con *H. pylori* en la mucosa gástrica (Caruso y col., 2008). Adicionalmente, IL-17 está asociada con la respuesta antimicrobiana y el control de la colonización de la bacteria en diversos modelos animales (Dixon y col., 2016). En este sentido, el microorganismo no fue recuperado del tejido pulmonar luego de los 14 días de infección; coincidiendo con valores elevados en la expresión de IL-17 a partir del día 7 hasta los 30 días PI (Fig. 23). Diversos autores proponen que la fuerte respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica sumada a la inducción de la síntesis de IL-17 en células epiteliales, endoteliales y fibroblastos por TNF- α contribuyen a la erradicación de *H. pylori* (Algood y Cover, 2006; Mukhopadhyay y col., 2006). Los resultados de esta tesis muestran que luego

de la máxima expresión observada a los 7 días PI para TNF- α ; aumenta la expresión de IL-17 a los 14 días PI (Fig. 31A).

IL-4 es una citoquina que promueve y regula la respuesta inmune. Así, algunos autores demuestran que la secreción de IL-17 está regulada negativamente, mientras que IL-10 es regulada positivamente (Fernández y col., 2018; Guenova y col., 2015). Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que la expresión de IL-17 se mantuvo elevada a partir de los 7 días PI independientemente de la expresión de IL-4. Sin embargo, IL-10 mostró un aumento de la expresión luego del aumento de IL-4 (Fig. 32). Eaton y col., (2001), proponen que altos niveles de IL-10 podrían enmascarar los efectos proinflamatorios de TNF- α . En los resultados obtenidos, los altos niveles de expresión de IL-10 coinciden con los bajos niveles de TNF- α (Fig. 31A y 32). Resultados similares fueron observados a 3 semanas (21 días) luego de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* (Aguilar y col., 2010; Roh y col., 2013).

Bajo estas condiciones de aumento de las citoquinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-17 e IL-8), las interacciones entre macrófagos activos, neutrófilos infiltrados, células alveolares y células endoteliales vasculares en el espacio alveolar potencian la inflamación induciendo un daño de moderado a severo, amplificando la cascada de reacciones de inflamación y modificación de síntesis del surfactante (Fig. 31 A y B) (Biaggio y col., 2010).

La peroxidación lipídica está relacionada con el estrés oxidativo en pulmón (Gutierrez y col., 2008). En esta investigación, en el modelo animal utilizado se visualizó que *H. pylori* promueve la peroxidación de los lípidos, aumentando los niveles de MDA. A los 3, 7 y 21 días PI, los niveles de TBAR's aumentaron en el grupo infectado. En contraste, al día 14, la concentración de TBARS no aumento significativamente, entre ambos grupos (C e I) (Fig. 33). Estos resultados brindan evidencia adicional respecto a que el estrés oxidativo es importante en la infección por *H. pylori*, en el pulmón. Además, la estimulación de IL-1 β y TNF- α causa la proliferación de fibroblastos y producción de metabolitos tales como EROs y especies reactivas de nitrógeno (NO). Estos metabolitos, podrían contribuir al daño del tejido (Laskin y col., 1995).

Es necesario destacar que, para balancear los sistemas oxidantes - antioxidantes en pulmón, aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes dentro de las cuales se encuentra la

catalasa. Por lo que para eliminar los peróxidos producto de la acción oxidante PI, el pulmón aumenta la actividad de catalasa. En este estudio, al determinar la actividad de catalasa, se observó un aumento a los 3, 7 y 21 días PI, coincidentemente con el aumento de los valores de TBAR's (Fig. 34).

El LPS y la ureasa de *H. pylori*, así como citoquinas proinflamatorias pueden inducir la expresión de la enzima iNOS a través de la activación de diversas vías de señalización. La enzima cataliza la conversión del aminoácido L-arginina en óxido nítrico (ON), el cual posee propiedades antibacterianas y antivirales. No obstante, el exceso del mismo se ve involucrado en desórdenes inflamatorios e infecciosos (Allen 2007; Cherdantseva y col., 2014; Dang y col., 2017). Los peroxinitritos, que derivan de la reacción de aniones superóxido con ON, poseen una fuerte actividad oxidante y nitrante la cual es tóxica para patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* o *Salmonella spp.* Sin embargo, en el caso de *H. pylori*, se ha demostrado que no es efectivo, ya que el microorganismo posee una enzima arginasa que convierte L-arginina en urea y posteriormente, esa urea es desdoblada por la ureasa. L-arginina es el sustrato tanto para iNOS, proveniente de los macrófagos, como para la arginasa de *H. pylori*; por lo tanto, el consumo de este aminoácido por la bacteria limita la producción de NO por consumo del sustrato (Allen 2007). En este estudio, la expresión del ARNm que codifica para iNOS, aumenta gradualmente durante los primeros días de infección, con un pico máximo a los 14 días PI, disminuyendo a los 30 días (Fig. 35). Resultados similares fueron obtenidos por Aguilar y col. (2010) en los pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis*. Sumado a esto, se ha planteado que posiblemente metabolitos secundarios de nitritos puedan actuar como potentes quimiotácticos para PMN y macrófagos (Gómez y col., 2006).

El efecto de la alteración en el metabolismo de los fosfolípidos del surfactante y su influencia en la patogénesis de las enfermedades pulmonares es a menudo menospreciado debido a que la atención es frecuentemente enfocada en la fuente primaria, los neumocitos tipo II. CCT es considerado un marcador del daño en el parénquima pulmonar que lleva a la alteración de la síntesis del surfactante. En este estudio, se observaron altos valores del marcador a los 7 días de infección y en los últimos días de infección lo que compromete la síntesis del principal componente del surfactante pulmonar, afectando la función del órgano. Estos resultados

están de acuerdo con el daño en el tejido pulmonar observado mediante el análisis histológico para la infección con *H. pylori* planteada en este estudio (Fig. 43); resultados que son coincidentes a los observados con otros microorganismos en el mismo modelo experimental (Gómez y col., 2006; Biaggio y col., 2010). Sumado a esto, la alteración de la homeostasis es comúnmente considerada una consecuencia secundaria inevitable del daño y desregulación de los neumocitos tipo II.

Kienesberger y col. (2016) realizaron un estudio para entender el efecto de la colonización gástrica por *H. pylori* en la respuesta inmune local y sistémica. El análisis histológico del estómago de los ratones infectados mostró una inflamación dominante en la zona del corpus con una mezcla de infiltraciones de neutrófilos y mononucleares alrededor de las glándulas gástricas. Además, los autores observaron un aumento en la infiltración con formación de espacios no funcionales, a medida que progresaba la infección. De forma similar, en este estudio las muestras de pulmón mostraron una infiltración de PMN alrededor del árbol bronquial a los 3 días PI. Conforme a esto, se ha demostrado que la patogénesis de algunas enfermedades del sistema respiratorio superior como por ejemplo otitis y sinusitis, tienen un comportamiento similar a la patogénesis de la gastritis generada por *H. pylori*, con gran respuesta inflamatoria (Kurtaran y col., 2008).

En la mucosa gástrica, la infiltración de células inflamatorias es un factor común en la infección de *H. pylori* y el grado del daño de la mucosa se relaciona con la infiltración de PMN (D'Elios y col., 2007). La tinción con H&E de las secciones de pulmones obtenidos de los ratones infectados con *H. pylori*, a los 3 días después de la infección reveló un foco de infiltración inflamatoria en los bronquiolos y alvéolos adyacentes que no fue observado en el pulmón de los animales no infectados. Además, el espacio intersticial contiene numerosas células mononucleares inflamatorias que se trasvasaron; siendo predominante la presencia de polimorfonucleares, cuando se los compara con los controles (Fig. 38). Estos resultados son similares a los obtenidos para un estudio de fibrosis pulmonar, donde a los 3 días, los animales tratados mostraron infiltración de PMN (Cabrera-Benítez y col., 2016).

Neutrófilos y macrófagos activos también degradan lípidos del surfactante sugiriendo que ambos tipos celulares podrían contribuir a su alteración (Quinteros y col., 2002). En este estudio, a los 7 días PI, la tinción H&E mostró fragmentación de los septos alveolares,

proliferación focal intersticial e infiltración de células mononucleares inflamatorias. En este sentido, la IL-17 podría contribuir a la destrucción mediante la inducción de la producción de PMN (Mitchell y col., 2007). Por otro lado, cuando *H. pylori* invade la mucosa gástrica, la presencia de neutrófilos es característica; y cobran importancia si la infección es crónica, porque dañan grandes segmentos del epitelio y erosionan la mucosa, pudiendo producir úlceras (Ieni y col., 2016). De manera similar, la infección por *H. pylori* en el tejido pulmonar, induce los mismos efectos, donde se observó una gran infiltración de neutrófilos que se mantuvo en el tiempo. Cambios significativos en el parénquima del pulmón se observaron en los animales infectados en comparación con los animales controles a los 21 y 30 días luego de la infección. Mediante la tinción con tricrómico de Masson, se observó un aumento del colágeno en las paredes alveolares de los pulmones infectados, especialmente al día 30 PI (Fig. 46). Similares resultados fueron obtenidos por Cabrera-Benítez y col. (2016) en el estudio de fibrosis pulmonar, donde a los 15 días de producido el tratamiento de los ratones, se observó un aumento de las áreas de depósito de colágeno, asociado con un adelgazamiento de las paredes de los alvéolos. La metaplasia de la mucosa está asociada con inflamación crónica en las enfermedades pulmonares. Desde el día 7 PI, la tinción de PAS mostró metaplasia de la mucosa en el pulmón de los ratones infectados (Fig. 45). Además, iNOS e IL-8 aumentaron con el daño pulmonar, lo que indica un aumento de los niveles de EROs y de nitrógeno que potencian el daño del tejido.

Estudios recientes, demostraron que *H. pylori* puede tener un comportamiento intracelular facultativo, pudiendo vivir dentro de los macrófagos y escapando del sistema inmune del hospedador (Iene y col., 2011). En los resultados obtenidos se puede destacar la presencia de macrófagos activos, con vesículas y en algunos casos bacilos helicoidales a partir del día 3 de infección. Durante la evolución de la infección, se observó la presencia de macrófagos grandes activos a los 14 días, el cual podría tratarse de los megasomas, estructuras que surgen como producto de la fusión de macrófagos inducidas por *H. pylori*. Sumado a ello, *H. pylori* adopta formas cocoides dentro del macrófago, que son viables, pero no cultivables. Probablemente esto fue una de las causas que no permitió recuperar el microorganismo en medios específicos, sumado a la destrucción del tejido pulmonar de ratones infectados.

Los resultados obtenidos sugieren que el mecanismo patogénico de *H. pylori* en el pulmón está fuertemente evidenciado con el daño en el tejido pulmonar asociado con un aumento en la expresión de mediadores inflamatorios y marcadores de disfunción endotelial. Este conocimiento es crucial para el entendimiento de cómo las células mononucleares inflamatorias y células fagocíticas participan en la defensa antimicrobiana del hospedador y causan daño inflamatorio del tejido, teniendo en cuenta que podrían ser un posible blanco para terapia farmacológica.

El impacto de la infección de *Helicobacter pylori* en el sistema respiratorio representa un campo con datos inconclusos y respuestas pendientes. Esta tesis, utilizando un modelo animal, es el primer trabajo cuyos resultados revelan el potencial patogénico de la bacteria evidenciado por el daño del tejido, la expresión de mediadores inflamatorios y marcadores de disfunción endotelial a nivel pulmonar.

Conclusiones

Conclusiones

- ✓ *Helicobacter pylori* infectó el pulmón de los ratones BALB/c y pudo ser aislado de los mismos en agar sangre a los días 3 y 7 luego de la infección; mientras que la detección molecular se logró hasta el día 21 post-infección.
- ✓ La recuperación del microorganismo a partir de los GLM no fue posible, lo que indicaría que hubo una infección localizada a nivel pulmonar. Tampoco se aislaron microorganismos del estómago, sin embargo, se observaron úlceras indicando lesión en la mucosa gástrica; probablemente por pasaje de los microorganismos al estómago debido a la vía de infección utilizada (orotraqueal) y una distribución en parches en la mucosa.
- ✓ El índice de inflamación medido por el agua retenida en los pulmones, de ratones infectados respecto de los controles, mostró un aumento a los 21 días PI siendo más notorio a los 30 días PI, lo que estaría indicando un aumento en la permeabilidad capilar como consecuencia de un edema pulmonar.
- ✓ Los niveles de los marcadores de disfunción endotelial I-CAM y V-CAM aumentan al día 7 PI y mantienen valores altos hasta el día 21; estos marcadores están relacionados con una alta movilidad de células de defensa; coincidentemente, en este periodo de tiempo se observa un aumento del flujo de PMN, linfocitos y macrófagos hacia el tejido pulmonar.
- ✓ La concentración de proteínas en LBA fue elevada en el día 7 luego de la infección, sin embargo, no presentó diferencia significativa con el resto de los tiempos; lo que indica que, en este proceso infeccioso en particular, no hay extravasación de proteínas hacia el espacio alveolar.
- ✓ La liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) es un indicador de daño celular. En este estudio, los niveles de la enzima aumentaron con el tiempo de infección, indicando que el daño celular producido por la infección, se incrementa progresivamente a medida que transcurre el tiempo de infección.

- ✓ La defensa del sistema respiratorio a nivel del árbol bronquial está alterada, observándose una disminución de la población de macrófagos presentes, en este compartimento pulmonar (LBA), acompañado de un incremento de linfocitos.
- ✓ La cinética de las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-17 e IL-8) durante el periodo de estudio, mostró una gran heterogeneidad en la expresión de cada una de ellas, lo que demuestra el proceso inflamatorio en el pulmón infectado.
- ✓ IL-1 β produce agrandamiento de espacios aéreos distales, metaplasia de mucus y adelgazamiento de la vía aérea y fibrosis. Además, aumenta la producción de MMP-9.
- ✓ IL-1 β y TNF- α promueven la proliferación de fibroblastos y producción de EROs y especies reactivas de nitrógeno, incrementando el daño causando al tejido.
- ✓ La cinética de las citoquinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) mostraron heterogeneidad en la expresión con un aumento máximo de IL-4 en el día 7 PI y un incremento un poco más bajo en el día 21 PI; mientras que IL-10 incrementa gradualmente hasta el día 14, donde logra su pico máximo y desciende progresivamente hasta el día 30, coincidentemente con la disminución de la expresión de TNF- α a partir del día 14 PI; lo que indica el papel regulador de estas citoquinas en la respuesta inmune.
- ✓ Las interacciones de macrófagos activos, neutrófilos, células alveolares y endoteliales vasculares potencian la inflamación, inducen daño severo y amplifican la cascada de reacciones inflamatorias.
- ✓ A los 3, 7 y 21 días PI, los niveles de TBAR's aumentaron en el grupo infectado. Lo que indica que, *H. pylori* promueve la peroxidación de los lípidos producto del estrés oxidativo en pulmón, aumentando los niveles de MDA. Estos resultados brindan evidencia adicional respecto a que el estrés oxidativo es importante en la infección por *H. pylori*, incrementando el daño oxidativo de los lípidos estructurales y funcionales del pulmón.
- ✓ El aumento de la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa (CAT) estaría indicando un aumento de los peróxidos en este modelo experimental, producto de la infección, estableciendo un desbalance en los sistemas oxidantes-antioxidantes en pulmón.

- ✓ El aumento de la expresión de iNOS observado en este trabajo, indica que luego de la infección existe un aumento del estrés nitrosativo que podría inducir la nitración de proteínas y conducir a un marcado daño, tanto estructural como funcional del órgano.
- ✓ El aumento de la enzima MMP-9 entre los días 7 a 14 PI, demuestra que el estroma del pulmón sufre cambios importantes, como consecuencia del cuadro inflamatorio.
- ✓ El aumento de la expresión de la enzima fosfolisina citidiltransferasa (CCT), desde el día 14 PI, con una expresión máxima a los 21 días indicaría el compromiso de la función pulmonar producto de la infección producida.
- ✓ El análisis histológico de las muestras de pulmón permitió estudiar el impacto de la infección por *H. pylori* en ese órgano.
- ✓ La tinción con H&E permitió identificar la presencia de PMN y macrófagos alrededor del árbol respiratorio, así como también reconocer bacilos Gram-negativos característicos del microorganismo a los 3 días PI. Además, durante la evolución de la infección se observó mayor infiltración de PMN extendida en todo el parénquima del órgano, sobre todo a nivel del día 21 y 30 PI produciéndose cambios estructurales, como es la fusión de los alvéolos y procesos fibróticos.
- ✓ La tinción de PAS también confirmó el aumento de macrófagos a los 7 y 14 días PI.
- ✓ La tinción Tricrómico de Masson demostró un incremento del tejido conectivo en el estroma pulmonar, que se visualiza marcadamente a partir del día 14, detectándose a los 21 y 30 días evidencia de fibrosis pulmonar y aumento de espacios no funcionales lo que comprueba el compromiso del estroma pulmonar en esta infección.

El estómago humano es el nicho natural de *H. pylori* sin embargo, la capacidad del microorganismo para llegar a las vías respiratorias, junto con la similitud histopatológica entre enfermedades del sistema respiratorio y del tejido gástrico permiten considerar que *H. pylori* podría estar implicado como razón primaria o secundaria en la patogénesis de diversas enfermedades del sistema respiratorio.

Esta tesis, utilizando un modelo animal de infección en pulmón, es el primer trabajo cuyos resultados revelan el potencial patogénico de la bacteria, evidenciado por el daño del tejido, la expresión de mediadores inflamatorios y marcadores de disfunción endotelial a nivel pulmonar.

Desafíos futuros

Desafíos futuros

- ✓ Complementar los estudios de identificación de *H. pylori* en tejido pulmonar mediante la técnica de inmunohistoquímica.
- ✓ Estudiar si aceite de oliva virgen y sus principales antioxidantes fenólicos, ejercen efecto antimicrobiano sobre cepas de *H. pylori* e inhiben la inflamación de la mucosa gástrica y la activación de mastocitos inducidas por este microorganismo.

Bibliografía

Bibliografía

- ✓ Abdillahi SM, Tati R, Nordin SL, Baumgarten M, Hallgren O, Bjermer L, Erjefält J, Westergren-Thorsson G, Singh B, Riesbeck K, Mörgelin M. (2018). The pulmonary extracellular matrix is a bactericidal barrier against *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Implications for an in vivo innate host defense function of collagen VI. *Front Immunol* 9:1988.
- ✓ Aebischer T, Meyer TF, Andersen LP. (2010). Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter*. *Helicobacter*, 15(1):21-28.
- ✓ Aguilar D, Hanekom M, Mata D, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM, Hernandez-Pando R. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis (Edinb)*. 90(5):319-325.
- ✓ Algood HM1, Cover TL. (2006). *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. (4):597-613.
- ✓ Allen LAH, Schlesinger LS, Kang B. (2000). Virulent Strains of *Helicobacter pylori* Demonstrate Delayed Phagocytosis and Stimulate Homotypic Phagosome Fusion in Macrophages. *J Exp Med*. 191(1): 115–128.
- ✓ Allen LAH. (2007). Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. *Cellular microbiology* 9(4): 817-828.
- ✓ Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, TumminoPJ, CarusoA, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ. (1999). Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 397: 176-180.
- ✓ Álvarez-Arellano L, Maldonado-Bernal C. (2014). *Helicobacter pylori* and neurological diseases: Married by the laws of inflammation. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5: 400-404

- ✓ Angrill J, Sánchez N, Agustí C, Guilemany JM, Miquel R, Gomez J, Torres A. (2006). Does *Helicobacter pylori* have a pathogenic role in bronchiectasis? *Respir Med*, 100(7):1202-1207.
- ✓ Awaad AS, Alafeefy AM, Alasmary FAS, El-Meligy RM, Zain ME, Alqasoumi SI. (2017). Novel essential amino acid-sulfanilamide hybrid as safe anti-ulcerogenic agent with anti-*helicobacter pylori* activity. *Saudi Pharm J*. 25(7):967-971.
- ✓ Backert S, Neddermann M, Maubach G, Naumann M. (2016). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 21(1):19-25.
- ✓ Baharom F, Rankin G, Blomberg A, Smed-Sörensen A. (2017). Human Lung Mononuclear Phagocytes in Health and Disease. *Front Immunol*, 8:499.
- ✓ Bhowmick R, Maung N, Hurley BP, Ghanem EB, Gronert K, McCormick BA, Leong JM. (2013). Systemic disease during *Streptococcus pneumonia* acute lung infection requires 12-lipoxygenase-dependent inflammation. *J Immunol*. 191(10):5115-5123.
- ✓ Biaggio VS, Pérez Chaca MV, Valdéz SR, Gómez NN, Gimenez MS. Alteration in the expression of inflammatory parameters as a result of oxidative stress produced by moderate zinc deficiency in rat lung. *Exp Lung Res*. 36(1):31-44.
- ✓ Borkowski G, Sudhoff H, Koslowski F, Hackstedt G, Radü HJ, Luckhaupt H. (1997). A possible role of *Helicobacter pylori* infection in the etiology of chronic laryngitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 254(9-10):481-482.
- ✓ Borlace GN, Jones HF, Keep SJ, Butler RN, Brooks DA. (2011). *Helicobacter pylori* phagosome maturation in primary human macrophages. *Gut Pathogens* 3(1):3: 1-14.
- ✓ Bui D, Brown HE, Harris RB, Oren E. (2016). Serologic Evidence for Fecal-Oral Transmission of *Helicobacter pylori*. *Am J Trop Med Hyg*. 94(1):82-88.
- ✓ Bulut Y, Agacayak A, Karlidag T, Toraman ZA, Yilmaz M. (2006). Association of CagA+ *Helicobacter pylori* with adenotonsillar hypertrophy. *Tohoku J Exp Med*. 209(3):229-233.
- ✓ Burucoa C, Axon A. (2017). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 22 (1).
- ✓ Cabrera-Benítez NE, Parotto M, Post M, Han B, Spieth PM, Cheng WE, Valladares F, Villar J, Liu M, Sato M, Zhang H, Slutsky AS. (2012). Mechanical stress induces

lung fibrosis by epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Crit Care Med* 40(2): 510-517.

- ✓ Camberlein E, Cohen JM, José R, Hyams C, Callard R, Chimalapati S, Yuste J, Edwards LA, Marshall H, van Rooijen N, Noursadeghi M, Brown JS. (2015). Importance of bacterial replication and alveolar macrophage-independent clearance mechanisms during early lung infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 83(3):1181-1189.
- ✓ Campbell JJ, EC Butcher. (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*, 12:336–341.
- ✓ Caruso R, Fina D, Paoluzi OA, Del Vecchio Blanco G, Stolfi C, Rizzo A, Caprioli F, Sarra M, Andrei F, Fantini MC, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. (2008). IL-23-mediated regulation of IL-17 production in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Eur J Immunol*. 38(2):470-478.
- ✓ Caselli M, Zaffoni E, Ruina M, Sartori S, Trevisani L, Ciaccia A, Alvisi V, Fabbri L, Papi A. (1999). *Helicobacter pylori* and chronic bronchitis. *Scand J Gastroenterol*. 34(8):828-830.
- ✓ Castillo-Rojas G, Mazarí-Hiriart M, López-Vidal Y. (2004). *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública de México*. 46(6):538-548.
- ✓ Cava F, Cobas G. (2003). Dos décadas de *Helicobacter pylori*. *Vaccimonitor*. 12(1): 1-10.
- ✓ Chen J, Chen Z, Narasaraaju T, Jin N, Liu L. (2004). Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs. *Lab Invest*, 84(6):727-735.
- ✓ Chen Y, Wang L, Kang Q, Zhang X, Yu G, Wan X, Wang J, Zhu K. (2017). Heat Shock Protein A12B Protects Vascular Endothelial Cells Against Sepsis-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Cell Physiol Biochem*. 42(1):156-168.
- ✓ Cherdantseva LA, Potapova OV, Sharkova TV, Belyaeva YY, Shkurupiy VA. (2014). Association of *Helicobacter pylori* and iNOS production by macrophages and lymphocytes in the gastric mucosa in chronic gastritis. *J Immunol Res.*: 762514. Epub.

- ✓ Chmiela M, Gonciarz W. (2017). Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infections. *World J Gastroenterol*. 23(22):3964-3977.
- ✓ Chmiela M, Walczak N, Rudnicka K. (2018). *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles involvement in the infection development and *Helicobacter pylori*-related diseases. *Journal of biomedical science* 25(1):78.
- ✓ Cirak MY, Ozdek A, Yilmaz D, Bayiz U, Samim E, Turet S. (2003). Detection of *Helicobacter pylori* and its CagA gene in tonsil and adenoid tissues by PCR. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 129(11):1225-1229.
- ✓ Cornejo M, JA López, S Navarro, D García and PJ Patiño. (2000). Clinical and Molecular Characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by p47-phox deficiency. *Rev Med Chile*, 128: 5.
- ✓ de Korwin JD, Ianiro G, Gibiino G, Gasbarrini A. (2017). *Helicobacter pylori* infection and extragastric diseases in 2017. *Helicobacter*, 22(1): 1-8.
- ✓ Dang D, Zhang C, Zhang R, Wu W, Chen S, Ren J, Zhang P, Zhou G, Feng D, Sun T, Li Y, Liu Q, Li M, Xi Y, Jin Y, Duan G. (2017). Involvement of inducible nitric oxide synthase and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of enterovirus 71 infection. *Oncotarget*. 8(46): 81014–81026.
- ✓ D'Elia MM, Andersen LP. (2007). *Helicobacter pylori* Inflammation, Immunity, and Vaccines. *Helicobacter*. Suppl 1:15-19.
- ✓ Deng B, Li Y, Zhang Y, Bai L, Yang P. (2013). *Helicobacter pylori* infection and lung cancer: a review of an emerging hypothesis. *Carcinogenesis* 34(6): 1189-1195.
- ✓ Dimitriadi D. (2014). *Helicobacter pylori*: a sexually transmitted bacterium?. *Cent European J Urol*, 67(4):407-409.
- ✓ Dixon BR1, Radin JN, Piazuolo MB, Contreras DC, Algood HM. (2016). IL-17a and IL-22 Induce Expression of Antimicrobials in Gastrointestinal Epithelial Cells and May Contribute to Epithelial Cell Defense against *Helicobacter pylori*. *PLoS One*. 11(2): e0148514.
- ✓ Donaldson K, V Stone, PJA Born, LA Jimenez, PS Gilmour, RPF Schins et al. (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Nitric Oxide*, 11:1369-1382

- ✓ Dore MP, Sepulveda AR, El-zimaity H, Yamaoka Y, Osato MS, Mototsugu K, Nieddu AM, Realdi G, Graham DY. (2001). Isolation of *Helicobacter pylori* From Sheep — Implications for Transmission to Humans. *Am J Gastroenterol*, 96(5):1396-1401.
- ✓ Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82:47-95.
- ✓ Eaton KA1, Mefford M, Thevenot T. (2001). The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *J Immunol*. 166(12):7456-7461.
- ✓ Elsheikh MN, Mahfouz ME. (2005). Prevalence of *Helicobacter pylori* DNA in recurrent aphthous ulcerations in mucosa-associated lymphoid tissues of the pharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 131(9):804-808.
- ✓ Fahimi F, Tohidkia MR, Fouladi M, Aghabeygi R, Samadi N, Omid Y. (2017). Pleiotropic cytotoxicity of VacA toxin in host cells and its impact on immunotherapy. *Bioimpacts*, 7(1):59-71.
- ✓ Fan XG, Kelleher D, Fan XJ, Xia HX, Keeling PW. (1996). *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells. *Gut*. 38(1):19-22.
- ✓ Feng N, Wang Q, Zhou J, Li J, Wen X, Chen S, Zhu Z, Bai C, Song Y, Li H. (2016) Keratinocyte growth factor-2 inhibits bacterial infection with *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in a mouse model. *J Infect Chemother*. 22(1):44-52.
- ✓ Fernandez CP, Afrin F, Flores RA, Kim WH, Jeong J, Kim S, Lillehoj HS, Min W. (2018). Identification of duck IL-4 and its inhibitory effect on IL-17A expression in *R. anatipestifer*-stimulated splenic lymphocytes. *Mol Immunol*. 95:20-29.
- ✓ Filep JG, El Kebir D. (2009). Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *J Cell Biochem*, 108(5):1039-1046.
- ✓ Filippou N, Roussos A, Tsimpoukas F, Tsimogianni A, Anastasakou E, Mavrea S. (2002). *Helicobacter pylori* seroprevalence in patients with pulmonary tuberculosis. *J Clin Gastroenterol*. 34(2):189-190.
- ✓ Fukunaga K, Kohli P, Bonnans C, Fredenburgh LE, Levy BD. (2005). Cyclooxygenase 2 plays a pivotal role in the resolution of acute lung injury. *J Immunol*, 174(8):5033-5039.

- ✓ Fullerton D, Britton JR, Lewis SA, Pavord ID, McKeever TM, Fogarty AW. (2009). *Helicobacter pylori* and lung function, asthma, atopy and allergic disease: a population-based cross-sectional study in adults. *Int J Epidemiol*. 38(2):419-426.
- ✓ Gerth HJ. (1978). Influenza vaccination in factories. *Zentralbl Arbeitsmed Arbeitsschutz Prophyl*, 28(7):181-185.
- ✓ Gomez NN, Davicino RC, Biaggio VS, Bianco GA, Álvarez SM, Fischer P, Masnatta L, Rabinovich GA, Gimenez MS. (2006). Overexpression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in rat zinc-deficient lung: Involvement of a NF-kappaB dependent pathway. *Nitric Oxide*. 14(1):30-38.
- ✓ Goni E, Franceschi F. (2016). *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Helicobacter*, 21(1):45-48.
- ✓ González-Segovia R, Quintanar JL, Salinas E, Ceballos-Salazar R, Aviles-Jiménez F, Torres-López J. (2008). Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of guinea pig. *J Gastroenterol*. 43(6):441-447.
- ✓ Grübel P, Hoffman JS, Chong FK, Burstein NA, Mepani C, Cave DR. (1997). Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 35(6):1300-1303.
- ✓ Guenova E, Skabytska Y, Hoetzenecker W, Weindl G, Sauer K, Tham M, Kim KW, Park JH, Seo JH, Ignatova D, Cozzio A, Levesque MP, Volz T, Köberle M, Kaesler S, Thomas P, Mailhammer R, Ghoreschi K, Schäkel K, Amarov B, Eichner M, Schaller M, Clark RA, Röcken M, Biedermann T. (2015). IL-4 abrogates T(H)17 cell-mediated inflammation by selective silencing of IL-23 in antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112(7):2163-2168.
- ✓ Gülhan M, Ozyilmaz E, Tarhan G, Demirağ F, Capan N, Ertürk A, Canbakan S, Ayaşlıoğlu E, Gülhan E, Ahmed K. (2007). *Helicobacter pylori* in bronchiectasis: a polymerase chain reaction assay in bronchoalveolar lavage fluid and bronchiectatic lung tissue. *Arch Med Res*. 38(3):317-321.
- ✓ Gutiérrez JG, Valdez SR, Di Genaro S, Gómez NN. (2008). Interleukin-12p40 contributes to protection against lung injury after oral *Yersinia enterocolitica* infection. *Inflamm Res*. 57(11):504-511.

- ✓ Herzog EL, Brody AR, Colby TV, Mason R, Williams MC. (2008). Knowns and unknowns of the alveolus. *Proc Am Thorac Soc*, 5(7):778-782.
- ✓ Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153(2):420-429.
- ✓ Ieni A, Barresi V, Rigoli L, Fedele F, Tuccari G, Caruso RA. (2016). Morphological and Cellular Features of Innate Immune Reaction in *Helicobacter pylori* Gastritis: A Brief Review. *Int J Mol Sci* 17(1): 109.
- ✓ Ilvan A, Ozturkeri H, Capraz F, Cermik H, Kunter E. Investigation of *Helicobacter pylori* in bronchoscopic lung specimens of young male patients with bronchiectasis but without gastrointestinal symptoms. *Clin Microbiol Infect*. 10(3):257-260.
- ✓ Ishii K, Adachi T, Yasukawa J, Suzuki Y, Hamamoto H, Sekimizu K. (2014). Induction of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by pulmonary surfactant. *Infect Immun*. 82(4):1500-1510.
- ✓ Ji J, Dou H, Li X, Song Y, Li X, Li E, Tan R, Hou Y. (2014). Novel benzenediamine derivative FC99 ameliorates zymosan-induced arthritis by inhibiting ROR γ t expression and Th17 cell differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 46(10):829-836.
- ✓ Jun ZJ, Lei Y, Shimizu Y, Dobashi K, Mori M. (2005). *Helicobacter pylori* seroprevalence in patients with mild asthma. *Tohoku J Exp Med*. 207(4):287-291.
- ✓ Jun ZJ, Lei Y, Shimizu Y, Dobashi K, Mori M. (2006). High seroprevalence of *Helicobacter pylori* in chronic bronchitis among Chinese population. *Tohoku J Exp Med*. 208(4):327-331.
- ✓ Kanbay M, Gur G, Akcay S, Yilmaz U. (2005). *Helicobacter pylori* seroprevalence in patients with chronic bronchitis. *Respiratory Medicine* 99(10): 1213-1216.
- ✓ Kaptan ZK, Emir H, Uzunkulaoğlu H, Yücel M, Karakoç E, Koca G, Tüzüner A, Samim E, Korkmaz M. (2009). Determination of *Helicobacter pylori* in patients with chronic nonspecific pharyngitis. *Laryngoscope*. 119(8):1479-1483.

- ✓ Karnes WE Jr, Samloff IM, Siurala M, Kekki M, Sipponen P, Kim SW, Walsh JH. (1991). Positive serum antibody and negative tissue staining for *Helicobacter pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology*. 101(1):167-174.
- ✓ Kerr JR, Al-Khattaf A, Barson AJ, Burnie JP. (2000). An association between sudden infant death syndrome (SIDS) and *Helicobacter pylori* infection. *Arch Dis Child*, 83(5):429-434.
- ✓ Kienesberger S, Cox LM, Livanos A, Zhang XS, Chung J, Perez-Perez GI, Gorkiewicz G, Zechener EL, Blaser MJ. (2016). Gastric *Helicobacter pylori* infection affects local and distant microbial population and host responses. *Cell Rep*. 14(6): 1395-1407.
- ✓ King TE Jr, Pardo A, Selman M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 378(9807):1949-1961.
- ✓ Kivrak Salim D, Sahin M, Köksoy S, Adanir H, Süleymanlar I. (2016). Local Immune Response in *Helicobacter pylori* Infection. *Medicine (Baltimore)*, 95(20):e3713.
- ✓ Kondo N, Temma T, Aita K, Shimochi S, Koshino K, Senda M, Iida H. (2018). Development of matrix metalloproteinase-targeted probes for lung inflammation detection with positron emission tomography. *Sci Rep*. 8(1):1347.
- ✓ Koshiol J, Flores R, Lam TK, Taylor PR, Weinstein SJ, Virtamo J, Albanes D, Perez-Perez G, Caporaso NE, Blaser MJ. (2012). *Helicobacter pylori* seropositivity and risk of lung cancer. *PLoS One*, 7(2):e32106.
- ✓ Kreuter M, Kirsten D, Bahmer T, Penzel R, Claussen M, Ehlers-Tenenbaum S, Muley T, Palmowski K, Eichinger M, Leider M, Herth FJ, Rabe KF, Bittmann I, Warth A. (2016). Screening for *Helicobacter pylori* in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Lung Biopsies. *Respiration*. 91(1):3-8.
- ✓ Krzyżek P, Biernat MM, Gościński G. (2018). Intensive formation of coccoid forms as a feature strongly associated with highly pathogenic *Helicobacter pylori* strains. *Folia Microbiol (Praha)*. doi: 10.1007/s12223-018-0665-5. [Epub ahead of print]
- ✓ Kumar P, S Sharma, M Khanna and HG Raj. (2003). Effect of quercetin on lipid peroxidation and changes in lung morphology in experimental influenza virus infection. *Int J Exp Path*, 84:127-133.

- ✓ Kurtaran H, Uyar ME, Kasapoglu B, Turkay C, Yilmaz T, Akcay A, Kanbay M. (2008). Role of *Helicobacter pylori* in pathogenesis of upper respiratory system diseases. J Natl Med Assoc. 100(10):1224-1230.
- ✓ Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Clinical microbiology reviews. 19(3): 449–490.
- ✓ Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. (2005). Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. Am J Respir Cell Mol Biol. 32(4):311-318.
- ✓ Larussa T, Gervasi S, Liparoti R, Suraci E, Marasco R, Imeneo M, Luzzza F. (2018). Downregulation of Interleukin- (IL-) 17 through Enhanced Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Induction by Curcumin: A Potential Mechanism of Tolerance towards *Helicobacter pylori*. J Immunol Res. Volume 2018, Article ID 3739593.
- ✓ Laskin DL, Pendino KJ. (1995). Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 35:655-677.
- ✓ Lee HY, Kim JW, Lee JK, Heo EY, Chung HS, Kim DK. (2016). Association between *Helicobacter pylori* seropositivity and mild to moderate COPD: clinical implications in an Asian country with a high prevalence of *H. pylori*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 31(11):2055-2062.
- ✓ Lehmann M, Buhl L, Alsafadi HN, Klee S, Hermann S, Mutze K, Ota C, Lindner M2, Behr J, Hilgendorff A, Wagner DE, Königshoff M. (2018). Differential effects of Nintedanib and Pirfenidone on lung alveolar epithelial cell function in ex vivo murine and human lung tissue cultures of pulmonary fibrosis. Respir Res. 19(1):175.
- ✓ Li H, Liao T, Debowski AW, Tang H, Nilsson HO, Stubbs KA, Marshall BJ, Benghezal M. (2016). Lipopolysaccharide Structure and Biosynthesis in *Helicobacter pylori*. Helicobacter, 21(6):445-461. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 136(5):468-470.
- ✓ Lin HC, Wu PY, Friedman M, Chang HW, Wilson M. (2011). Difference of *Helicobacter pylori* colonization in recurrent inflammatory and simple hyperplastic tonsil tissues.
- ✓ MacNee W. (2000). Oxidants/antioxidants and COPD. Chest, 117(5 Suppl 1):303S-17S.

- ✓ Magalhães AF, Carvalhaes A, Natan-Eisig J, Paraíso-Ferraz JG, Trevisan M, Zaterkaad S. (2005). CagA status and *Helicobacter pylori* eradication among dyspeptic patients. *Gastroenterol Hepatol* 28(8):441-444.
- ✓ Malfertheiner MV., Kandulski A., Schreiber J., Malfertheiner P. (2011). *Helicobacter pylori* Infection and the Respiratory System: A Systematic Review of the Literature *Digestion*, 84:212–220.
- ✓ Malik M, Bakshi CS, McCabe K, Catlett SV, Shah A, Singh R, Jackson PL, Gaggar A, Metzger DW, Melendez JA, Blalock JE, Sellati TJ. (2007). Matrix metalloproteinase 9 activity enhances host susceptibility to pulmonary infection with type A and B strains of *Francisella tularensis*. *J Immunol*. 178(2):1013-1020.
- ✓ Marchetti M, Aricò B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. (1995). Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*, 267(5204):1655-1658.
- ✓ Mentis A, Lehours P, Mégraud F. (2015). Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 20 (1): 1-7.
- ✓ Mitchell P, Germain C, Fiori PL, Khamri W, Foster GR, Ghosh S, Lechler RI, Bamford KB, Lombardi G. (2007). Chronic exposure to *Helicobacter pylori* impairs dendritic cell function and inhibits Th1 development. *Infect Immun*. 75(2):810-819.
- ✓ Momtaz H, Dabiri H, Souod N, Gholami M. (2014). Study of *Helicobacter pylori* genotype status in cows, sheep, goats and human beings. *BMC Gastroenterol*, 3(14):1-7.
- ✓ Montero Campos V. (2009). Environmental approaches in the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Rev Costarr Salud Pública*, 18: 84-93.
- ✓ Morinaka S, Ichimiya M, Nakamura H. (2003). Detection of *Helicobacter pylori* in nasal and maxillary sinus specimens from patients with chronic sinusitis. *Laryngoscope*. 113(9):1557-1563.
- ✓ Moyat M, Velin D. (2014). Immune responses to *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*, 20(19):5583-5593.
- ✓ Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. (2006). Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res*. 11(7):125.

- ✓ Nakashima S, Kakugawa T, Yura H, Tomonaga M, Harada T, Hara S, Nakano M, Yamasaki E, Sakamoto N, Ishimtsu Y, Isomoto H, Gochuico BR, Suffredini AF, Mukae H, Kurazono H, Hirayama T, Moss J, Kohno S. (2015). Identification of *Helicobacter pylori* VacA in human lung and its effects on lung cell. Biochemical and Biophysical Research Communications 460(3): 721-726.
- ✓ Ogaya Y, Nomura R, Watanabe Y, Nakano K. (2015). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in inflamed dental pulp specimens from Japanese children and adolescents. J Med Microbiol, 64(Pt 1):117-123.
- ✓ Olivera-Severo D, Uberti AF, Marques MS, Pinto MT, Gomez-Lazaro M, Figueiredo C, Leite M, Carlini CR. (2017). A New Role for *Helicobacter pylori* Urease: Contributions to Angiogenesis. Front Microbiol. 8:1883. eCollection.
- ✓ Osman EY, El-Eragi AM, Musa AM, El-Magboul SB, A/Rahman MB, Abdo AE. (2015). Detection of *Helicobacter pylori* glmM gene in bovine milk using Nested polymerase chain reaction. Vet World, 8(7):913-917.
- ✓ Pachathundikandi Kumar S, Brandt S, Madassery J, Backert S. (2011). Induction of TLR-2 and TLR-5 Expression by *Helicobacter pylori* Switches cagPAI-Dependent Signalling Leading to the Secretion of IL-8 and TNF- α . PLoS One. 6(5):e19614.
- ✓ Pagliari M, Munari F, Toffoletto M, Lonardi S, Chemello F, Codolo G, Millino C, Della Bella C, Pacchioni B, Vermi W, Fassan M, de Bernard M, Cagnin S. (2017). *Helicobacter pylori* Affects the Antigen Presentation Activity of Macrophages Modulating the Expression of the Immune Receptor CD300E through miR-4270. Frontiers in Immunology 12(8):1288.
- ✓ Pietro Chinchilla P. (2010). Papel anti-apoptótico de la lipoxina A4 en macrófagos: implicaciones en la resolución de la inflamación. Tesis Doctoral.
- ✓ Qiu FH, Devchand PR, Wada K, Serhan CN. (2001). Aspirin-triggered lipoxin A4 and lipoxin A4 up-regulate transcriptional corepressor NAB1 in human neutrophils. FASEB J. 15(14):2736-2738.
- ✓ Quintero OA, Wright JR. (2002). Clearance of surfactant lipids by neutrophils and macrophages isolated from the acutely inflamed lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 282(2):L330-339.

- ✓ Radin JN, González-Rivera C, Ivie SE, McClain MS, Cover TL. (2011). *Helicobacter pylori* VacA induces programmed necrosis in gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 79(7):2535-2543.
- ✓ Ramarao N, Gray-Owen SD, Backert S, Meyer TF. (2000). *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. *Mol Microbiol.* 37(6):1389-1404.
- ✓ Ramstedt U, Serhan CN, Nicolaou KC, Webber SE, Wigzell H, Samuelsson B. (1987). Lipoxin A-induced inhibition of human natural killer cell cytotoxicity: studies on stereospecificity of inhibition and mode of action. *J Immunol*, 138(1):266-270.
- ✓ Ravelo Rodríguez R, López Hernández M, Gutiérrez García R, Valladares Parrila F. (2012). Papel de los neumocitos II en un modelo experimental de lesión pulmonar aguda. *Majorensis* 8: 21-31.
- ✓ Rivas-Traverso F, Hernández F. (2000). *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed* 11:187-205.
- ✓ Roh IS, Cho S, Eum SY, Cho SN. (2013). Kinetics of IFN-gamma and TNF-alpha gene expression and their relationship with disease progression after infection with *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Yonsei Med J.* 54(3):707-714.
- ✓ Romo González C, Coria Jiménez VR. (2010). *Helicobacter pylori*, un modelo de bacteria carcinogénica. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 15(4): 242-251.
- ✓ Roussos A, Philippou N, Krietsipi V, Anastasakou E, Alepopoulou D, Koursarakos P, Iliopoulos I, Gourgoulidis K. (2005). *Helicobacter pylori* seroprevalence in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 99(3):279-284.
- ✓ Roussos A, Philippou N, Mantzaris GJ, Gourgoulidis KI. (2006). Respiratory diseases and *Helicobacter pylori* infection: is there a link?. *Respiration* 73(5):708-714.
- ✓ Sabbagh P, Mohammadnia-Afrouzi M, Javanian M, Babazadeh A, Koppolu V, Vasigala VR, Nouri HR, Ebrahimpour S. (2018). Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection: ideals, options, and limitations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* doi: 10.1007/s10096-018-3414-4.

- ✓ Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Rossi GA. (2004). Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Paediatr Respir Rev*, 5(A):35-40.
- ✓ Salama NR, Hartung ML, Müller A. (2013). Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*, 11(6):385-399.
- ✓ Samareh Fekri M, Hashemi Bajgani SM, Rasti A, Yazdani R, Mollaie HR. (2014). Detection of *Helicobacter pylori* in bronchoalveolar lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease by real time polymerase chain reaction. *Jundishapur J Microbiol*. 8(1): e14551.
- ✓ Samareh-Fekri M, Hashemi Bajgani SM, Shafahi A, Asadi-Zarandi M, Mollaie H, Jamali Paghalhe A. (2016). Detection of *Helicobacter pylori* in the Bronchoalveolar Lavage of Patients with Lung Cancer Using Real-Time PCR. *Jundishapur J Microbiol*. 9(11):e32144.
- ✓ Scarpelli EM. (1998). The alveolar surface network: a new anatomy and its physiological significance. *Anat Rec*, 251(4):491-527.
- ✓ Schleimer RP, Kato A, Peters A, Conley D, Kim J, Liu MC, Harris KE, Kuperman DA, Chandra R, Favoreto S, Avila PC, Grammer LC, Kern RC. (2004). Epithelium, Inflammation, and Immunity in the Upper Airways of Humans Studies. *Proc Am Thorac Soc Vol 6*: 288–294.
- ✓ Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. (2008). Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol*, 3:279-312.
- ✓ Shams-Housseini NS, Javad Mousavi SA, Kadivar M, Ahmadipour E, Yazdani R, Moradians V. (2011). *Helicobacter pylori* in patients suffering from pulmonary disease. *Tanaffos* 10(1): 31-36.
- ✓ Soehnlein O, Lindbom L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10(6):427-439.
- ✓ Sonnenberg A, Lash RH, Genta RM. (2010). A national study of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsy specimens. *Gastroenterology*. 139(6):1894-1901.

- ✓ Speyer CL, Gao H, Rancilio NJ, Neff TA, Huffnagle GB, Sarma JB, Ward PA. (2004). Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Immunopathol Infect Dis*, 165 (6):2187-2196.
- ✓ Stachowicz-Kuśnierz A, Cwiklik L, Korchowiec J, Rogalska E, Korchowiec B. (2018). The impact of lipid oxidation on the functioning of a lung surfactant model. *Phys Chem Chem Phys*. 20(38):24968-24978.
- ✓ Stone MA. (1999). Transmission of *Helicobacter pylori*. *Postgrad Med J*, 75:198–200.
- ✓ Suerbaum S, Michetti P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, 347(15):1175-1186.
- ✓ Suzuki H, Franceschi F, Nishizawa T, Gasbarrini A. (2011). Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 16(1):65-69.
- ✓ Tabaru A, Gorguner M, Akgun M, Meral M, Sahin A. (2012). *Helicobacter pylori* infections in chronic obstructive pulmonary disease. *Eurasian J Med*, 44(3):144-148.
- ✓ Taniguchi T, Saeki Y, Okayama A, Hayashi T, Misawa N. (2017). Extraintestinal infection of *Helicobacter cinaedi* induced by oral administration to Balb/c mice. *Microbiol Immunol*. 61(2):57-63.
- ✓ Tannaes, T, Bukholm G. (2005) Cholesteryl-6-O-acyl- α -D-glucopyranoside of *Helicobacter pylori* relate to relative lysophospholipid content. *FEMS Microbiol Lett* 244: 117.
- ✓ Tavares R, Pathak SK. (2014). *Helicobacter pylori* protein JHP0290 exhibits proliferative and anti-apoptotic effects in gastric epithelial cells. *PLoS One*. 10(4): e0124407. eCollection.
- ✓ Terebiznik MR, Vazquez CL, Torbicki K, Banks D, Wang T, Hong W, Blanke SR, Colombo MI, Jones NL. (2006). *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infect Immun*. 74(12):6599-6614.
- ✓ Testerman TL, Morris J. (2014). Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol*, 20(36):12781-12808.
- ✓ Thorell K, Lehours P, Vale FF. (2017). Genomics of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 22(1).

- ✓ Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539–547.
- ✓ Torres L, Rodríguez BL. (2008). Principales factores de patogenia en la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 39(1): 52-62.
- ✓ Tsang KW, Lam WK, Chan KN, Hu W, Wu A, Kwok E, Zheng L, Wong BC, Lam SK. (2000). *Helicobacter pylori* sero-prevalence in asthma. *Respir Med.* 94(8):756-759.
- ✓ van den Berg E, Bem RA, Bos AP, Lutter R, van Woensel JB. (2014). The effect of TIP on pneumovirus-induced pulmonary edema in mice. *PLoS One.* 21;9(7): e102749.
- ✓ Vega AE, Cortiñas TI, Puig ON, Silva HJ. (2010). Molecular characterization and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* strains isolated in western Argentina. *Int J Infect Dis.* 14(3):85-92.
- ✓ Velin D, Michetti P. (2006). Immunology of *Helicobacter pylori* infection. *Digestion,* 73(2-3):116-123.
- ✓ Voss BJ, Gaddy JA, McDonald WH, Cover TL. (2014). Analysis of surface-exposed outer membrane proteins in *Helicobacter pylori*. *Bacteriol,* 196(13):2455-2471.
- ✓ Vukovac EL, Lozo M, Mise K, Gudelj I, Puljiz Ž, Jurcev-Savicevic A, Bradaric A, Kokeza J, Mise J. (2014). Bronchoalveolar pH and inflammatory biomarkers in newly diagnosed IPF and GERD patients: A case-control study. *Med Sci Monit.* 2014; 20: 255–261.
- ✓ Wunder C, Churin Y, Winau F, Warnecke D, Vieth M, Lindner B, Zähringer U, Mollenkopf HJ, Heinz E, Meyer TF. (2006). Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat Med.* 12(9):1030-1038.

- ✓ Wibawa T, Surono A, Widodo I. (2011). Isolation of viable *Helicobacter pylori* in the tonsillar tissues of chronic tonsillitis patients. J Infect Dev Ctries. 5(7): 561-564.
- ✓ Xianchu L, Lan Z, Ming L, Yanzhi M. (2018). Protective effects of rutin on lipopolysaccharide-induced heart injury in mice. J Toxicol Sci. 43(5):329-337.
- ✓ Yamamoto N, Kawakami K, Kinjo Y, Miyagi K, Kinjo T, Uezu K, Nakasone C, Nakamatsu M, Atsushi S. (2004). Essential role for the p40 subunit of interleukin-12 in neutrophil-mediated early host defense against pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*: involvement of interferon- γ . Microb and Infect, 6:1241-1249.
- ✓ Zamani M, Vahedi A, Maghdouri Z, Shokri-Shirvani J. (2017). Role of food in environmental transmission of *Helicobacter pylori*. Caspian J Intern Med. 8(3):146-152.